



CARACTÉRISATION DES COMPLEXES CYCLINE-CDC28 IMPLIQUÉS DANS LA  
RÉSECTION DES TÉLOMÈRES DÉPROTÉGÉS CHEZ *Saccharomyces cerevisiae*.

par

Maesumeh Korei

mémoire présenté au Département de biologie en vue  
de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES  
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, septembre 2015

Le 22 septembre 2015

*le jury a accepté le mémoire de Madame Maesumeh Korei  
dans sa version finale.*

Membres du jury

Professeur Momtchil D. Vodenitcharov  
Directeur de recherche  
Département de Biologie, Université de Sherbrooke

Professeur Raymund J. Wellinger  
Évaluateur interne  
Département de Microbiologie et infectiologie, Université de Sherbrooke

Professeur Daniel A. Lafontaine  
Président-rapporteur  
Département de Biologie, Université de Sherbrooke

## SOMMAIRE

Dans les cellules eucaryotes, les extrémités des chromosomes linéaires sont protégées par une structure nucléoprotéique, appelée télomère. Un télomère non fonctionnel peut induire des réarrangements de chromosomes et d'instabilité génomique, et ainsi, contribuer au vieillissement ou au développement de cancers. L'instabilité génomique est initiée par une réparation nuisible des extrémités chromosomiques, dont certains aspects sont régulés par la principale kinase du cycle cellulaire, Cdc28 (ou Cdk1 pour *Cyclin dependant kinase 1*), chez *Saccharomyces cerevisiae*. Par exemple, la déstabilisation des télomères induite par l'inactivation de la protéine Cdc13, une des protéines de la coiffe protectrice du télomère, conduit à la résection extensive et non contrôlée des extrémités des chromosomes, promue par la kinase Cdc28.

La kinase Cdc28 n'est pas en mesure d'accomplir ses fonctions par elle-même; elle est activée à l'aide d'une de ses neuf différentes sous-unités auxiliaires, appelées cyclines. Les cyclines sont non seulement responsables pour activer, mais aussi pour guider la kinase vers de substrats spécifiques lors l'exécution de ses nombreuses tâches. Alors, l'objectif des travaux de maîtrise fut de définir la contribution des sous-unités individuelles de cyclines, dans la dégradation des télomères non fonctionnels. Suite à la déprotection contrôlée des télomères par l'inactivation de la protéine Cdc13, l'effet des délétions de trois groupes de cyclines, cyclines précoces de la phase S, de la phase S ou de la phase M sur la croissance et sur la structure des télomères ont été déterminés.

En fonction des résultats obtenus, aucune simple délétion de cyclines de la phase S ne semble avoir un effet sur la dégradation des télomères. En général, les résultats pour les doubles délétions sont cohérents avec les observations faites avec les simples délétions, sauf que

certaines doubles délétions de cyclines de la phase S combinée avec l'allèle *cdc13-1* ont montrées une croissance détériorée et une accumulation plus élevée d'ADN sb aux télomères que les contrôles pertinents. Pourtant, aucune de ces doubles délétions ne supprime le phénotype de thermosensibilité d'allèle *cdc13-1*. Cependant, la viabilité des cellules *cdc13-1* contenant de triples délétions de S cyclines est gravement compromise par rapport au contrôle, les cellules *cdc13-1*, à une température semi-permissive, malgré que les niveaux de l'ADN sb aux télomères et l'activation de la DDR sont comparables à ceux du contrôle. Il est proposé que ceci pourrait refléter un effet combiné des délétions de cyclines et de Cdc13 sur la réplication ou, encore, une limitation de la technique utilisée pour la détection de l'ADN sb. À l'aide de l'expression contrôlée de Clb5, l'effet d'élimination de toutes les cyclines de la phase S a pu être étudié. Les résultats démontrent que la résection aux télomères et l'activation de la DDR suite à la déprotection ne sont pas réprimées en absence de toutes les cyclines de la phase S. Ces résultats suggèrent que les cyclines mitotiques sont probablement responsables pour l'accumulation d'ADN simple brin observée aux télomères déprotégés, mais l'expérimentation pour confirmer ou écarter cette possibilité n'était pas réalisée durant le terme de cette maîtrise.

Un deuxième objectif de mes travaux de maîtrise fut la mise au point dans notre laboratoire d'une technique basée sur la PCR quantitative qui permet de quantifier l'ADN simple brin et de suivre la dynamique de la résection aux télomères non fonctionnels, appelée QAOS (d'anglais *Quantitative Amplification of Single-stranded DNA*). La technique QAOS qui a été mise au point lors de ma maîtrise nous a permis de confirmer les résultats obtenus par la technique de l'hybridation non dénaturante.

Mots clés : télomère, *cdc13-1*, résection, ADN sb, Cdc28, cycline, DDR

## REMERCIEMENTS

Je remercie mon directeur de recherche, **Professeur Momtchil D. Vodenitcharov**, qui m'a accueilli dans son laboratoire, qui m'a guidé tout au long de la réalisation de ce mémoire avec ses conseils et ses directives qui m'ont énormément aidé dans l'orientation de mes objectifs et l'accomplissement de mes travaux. Je te remercie de m'avoir donné l'opportunité de développer ce sujet de façon relativement autonome. Ce contexte m'a permis de beaucoup apprendre quant au sujet sur les télomères, le cycle cellulaire et les techniques que j'ai utilisées au cours de ma recherche.

Je souhaite remercier les **Professeurs Daniel A. Lafontaine** et **Raymund J. Wellinger** qui me font l'honneur d'être les membres de mon comité de conseillers. Je remercie aussi les organismes subventionnaires, telles l'Université de Sherbrooke, la CRSNG et la Fondation canadienne pour l'innovation, pour avoir contribué au financement de ce travail.

J'aimerais remercier notre collaborateur du Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, **Dr. Éric Bailly**, pour nous avoir fourni les constructions de souches nécessaires pour l'amorcement de ce projet de maîtrise.

Je remercie aussi toutes mes amies et étudiant(e)s qui ont eu la très grande gentillesse de me faire sentir à l'aise au Département de Biologie au cours de mes deux ans de maîtrise et de répondre à mes milliers de petites questions.

Enfin je voudrais remercier ma famille pour leur inconditionnel, indéfectible soutien durant toutes ces années, je voudrais vous associer à cette réussite, car c'est avant tout la vôtre.

## TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE .....	i
REMERCIEMENTS .....	iii
TABLES DES MATIÈRES .....	iv
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	vii
LISTE DES TABLEAUX .....	ix
LISTE DES FIGURES .....	x

## CHAPITRE 1 : INTRODUCTION ..... 1

1.1 LES TÉLOMÈRES .....	1
1.1.1 La structure et composition des télomères chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ..	2
1.1.1.1 Répétitions télomériques .....	5
1.1.1.1.1 Les protéines du capuchon télomérique .....	7
1.1.1.1.1.1 Le complexe Rap1-Rif1-Rif2 .....	8
1.1.1.1.1.2 Le complexe Yku .....	10
1.1.1.1.1.3 Le complexe CST .....	11
1.1.1.2 Régions associées aux télomères (TAS) .....	13
1.1.2 La réplication des télomères chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	15
1.1.3 Les activités responsables de la formation des extensions 3' simple brin	20
1.2 LES CONSÉQUENCES DE LA DÉPROTECTION DES TÉLOMÈRES : PARALLÈLES ET DIFFÉRENCES ENTRE TÉLMÈRES ET CDB .....	24
1.2.1 La cassure double brin .....	25
1.2.2 Les télomères déprotégés de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	30
1.3 LE CYCLE CELLULAIRE .....	36
1.3.1 Le cycle cellulaire chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	36
1.3.2 Les kinases du cycle cellulaire .....	37
1.3.2.1 La fonction classique de Cdc28 .....	39
1.3.2.2 Les fonctions non classiques de Cdc28 .....	41
1.3.2.2.1 Cdc28 et la régulation du choix de voie de réparation durant le cycle cellulaire .....	42
1.3.2.2.2 Cdc28 et l'activation de checkpoint .....	43
1.3.2.2.3 Cdc28 et la résection au niveau des télomères .....	43
1.3.3 Les cyclines du cycle cellulaire chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	44
1.3.3.1 La famille des cyclines de la phase G1 (Cln1-3) .....	45
1.3.3.2 La famille des cyclines de type B (Clb1-6) .....	48
1.3.3.2.1 Clb5 et Clb6 .....	48

1.3.3.2.2	Clb3 et Clb4 .....	50
1.3.3.2.3	Clb1 et Clb2 .....	50
1.3.4	La spécificité des complexes cycline-Cdc28 .....	51
1.4	L'OBJECTIF DE TRAVAIL .....	56
<b>CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES .....</b>		<b>57</b>
2.1	CONSTRUCTION DE SOUCHES .....	57
2.2	ANALYSE DE CROISSANCE .....	62
2.2.1	Analyse par aire sous la courbe .....	63
2.2.2	Analyse par le logiciel GrowthRates .....	64
2.3	TESTS DE CROISSANCE SUR MILIEU SOLIDE .....	64
2.4	DÉPROTECTION DES TÉLOMÈRES ET RÉCOLTES D'ÉCHANTILLONS .....	65
2.5	LA TECHNIQUE DE L'HYBRIDATION NON DÉNATURANTE .....	66
2.5.1	Extraction et purification de l'ADN génomique .....	66
2.5.2	Préparation des échantillons .....	67
2.5.3	Préparation des sondes radiomarquées .....	68
2.5.3.1	Préparation des sondes télomériques par marquage d'oligonucléotides .....	68
2.5.3.2	Préparation d'une échelle radiomarquée .....	68
2.5.4	Électrophorèse et hybridation dans gel natif .....	69
2.5.5	Quantification des signaux .....	70
2.6	IMMUNOBUVARDAGE DE TYPE WESTERN .....	72
2.6.1	Extraction de protéines .....	72
2.6.2	Immunobuvardage .....	73
2.7	CYTOMÉTRIE EN FLUX .....	74
<b>CHAPITRE 3 : RÉSULTATS .....</b>		<b>75</b>
3.1	La délétion des cyclines précoces de la phase S ne rétablis pas la croissance des cellules avec télomères déprotégés .....	75
3.1.1	Analyses quantitatives de la croissance .....	76
3.1.2	La délétion des gènes <i>CLB5</i> et <i>CLB6</i> ne supprime pas la résection aux télomères déprotégés .....	80



3.1.3 L'activation de la réponse aux dommages à l'ADN suite à la déprotection des télomères n'est pas affectée dans les mutants <i>clb5Δ clb6Δ</i> .....	84
3.2 Les cyclines de la phase S ne sont pas impliquées dans la résection aux télomères déprotégés médiée par Cdc28 .....	86
3.2.1 Les délétions combinées de deux ou trois cyclines de la phase S ne supprime pas la résection et la thermosensibilité des cellules <i>cdc13-1</i> .....	89
3.2.2 La délétion de toutes les cyclines de la phase S n'est pas suffisante pour supprimer la résection aux télomères et la thermosensibilité des cellules <i>cdc13-1</i> .....	96
 <b>CHAPITRE 4 : MODIFICATION ET ADAPTATION DE LA TECHNIQUE QAOS À L'UTILISATION DU SYBR Green</b> .....	<b>105</b>
4.1 INTRODUCTION .....	105
4.1.1 Comparaison entre l'hybridation non dénaturante et le QAOS .....	106
4.1.2 Principe du QAOS .....	107
4.1.2.1 La technique QAOS originelle .....	107
4.1.2.2 La technique QAOS mise au point .....	109
4.2 MATÉRIEL ET MÉTHODES .....	111
4.2.1 Extraction et purification de l'ADN génomique .....	111
4.2.2 Quantification d'ADN et équilibrage des échantillons .....	112
4.2.3 Préparation des microplaques à 96 puits pour qPCR .....	113
4.3 RÉSULTATS ET DISCUSSION .....	114
4.4 CONCLUSION .....	123
RÉFÉRENCE .....	124
 <b>CHAPITRE 5 : DISCUSSION</b> .....	<b>127</b>
Conclusion et perspectives .....	133
 BIBLIOGRAPHIE .....	135

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

9-1-1 : complexe Rad9-Hus1-Rad1  
% : pourcentage  
 $\Delta$  : délétion  
 $\gamma$  : phosphorylation  
ADN : Acide DesoxyriboNucleique  
ARN : Acide RiboNucleique  
ARNm : Acide RiboNucleique messenger  
ARS : Origine de replication (*Autonomously Replicating Sequences*)  
b : base  
C : Cytosine  
CDB : Cassures Double Brin  
*cdc13-1* : allèle thermosensible du gène de la protéine Cdc13  
CDK : Kinase cycline-dépendante (*Cyclin Dependant Kinase*)  
CKI : *Cycline Kinase Inhibitor*  
CLB : *CycLin B*  
CLN : *CycLiN*  
CST : complexe Cdc13-Stn1-Ten1  
C-terminal : terminal carboxyle  
db : double brin  
DDK : *Dbf4-Dependent Kinase*  
DDR : *DNA Damage Response*  
dNTPs : desoxyNucleotides TriPhosphates (ATP, CTP, GTP, TTP)  
DO<sub>660</sub> : Densité Optique à 600nm  
DR : Domaine de Recrutement  
Exo1 : *EXOnuclease 1*  
FACS : cytométrie en flux (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*)  
G : Guanine  
G<sub>0</sub> : phase G zéro (quiescence) du cycle cellulaire  
G<sub>1</sub> : phase *Gap 1* du cycle cellulaire, première phase de croissance  
G<sub>2</sub> : phase pré-mitotique du cycle cellulaire  
H2A : Histone H2A  
H2A.Z : variant d'histone H2A  
ITS : Répétitions télomérique interne (*Internal Telomere Sequences*)  
JENH : Jonction des Extrémités Non-Homologue (pour *Non Homologous End Joining*)  
kb : kilobase  
M : Mitose  
mL : millilitre  
mM : millimolaire  
MBF : *Mlu1 cell cycle factor Binding Factor*

MCM : une helicase replicative (*MiniChromosome Maintenance*)  
 MRX : complexe Mre11-Rad50-Xrs2  
 Myb : Domaine Myb  
 nt : nucléotide  
 N-terminal : terminal amine (N)  
 PCR : Réaction en chaîne par polymérase (*Polymerase Chain Reaction*)  
 Pi3K : PhosphoInositide 3-Kinase  
 PP1 : Protéine Phosphatase 1  
 PPA2 : *PyroPhosphatase 2*  
 QAOS : *Quantitative Amplification of Single-stranded DNA*  
 qPCR : quantitative P  
 RH : Recombinaison homologue (pour *Homologous Recombination*)  
 RPA : *Replication Protein A*  
 S : phase de Synthèse du cycle cellulaire  
 sb : simple brin  
 SBF : *Swi4/6 cell cycle box Binding Factor*  
 TAS : Régions associées aux télomères (*Telomere Associated Sequences*)  
 TPE : *Telomere Position Effect*  
 t-RPA : *telomeric-RPA*  
 V(D)J : recombinaison somatique du locus d'immunoglobulines  
 WT : type sauvage (*Wild Type*)  
 XhoI : enzyme de restriction (*Xanthomonas HOlcicola*)  
 y : yeast

## LISTE DES TABLEAUX

### **CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES**

TABLEAU 2.1 Énumération des souches et leur génotype dans leur groupe respectif .. 58

TABLEAU 2.2 Liste des souches avec leur génotype complet ..... 58

### **CHAPITRE 4 : MODIFICATION ET ADAPTATION DE LA TECHNIQUE QAOS À L'UTILISATION DU SYBR Green**

Tableau 4.1 Mix réactionnel pour le QAOS ..... 113

Tableau 4.2 Amorces utilisées pour la quantification d'ADN total et pour le QAOS ... 114

Tableau 4.3 Programme de QAOS utilisé par le qPCR ..... 114

## LISTE DES FIGURES

### CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

Figure 1.1 Représentation schématique de la structure et de la composition en complexes protéiques des télomères chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	4
Figure 1.2 Représentation schématique de la réplication des télomères en fin de la phase S et la reconstitution de la structure habituelle du brin tardive par l'activité des nucléases .....	18
Figure 1.3 Représentation schématique des conséquences de la déprotection des télomères .....	25
Figure 1.4 Représentation schématique des ressemblances et des différences entre les facteurs qui réparent les extrémités des cassures double brin (CDB) et l'extrémité des télomères déprotégés .....	27
Figure 1.5 Modèle pour le rôle du complexe CST de la levure bourgeonnante <i>S. cerevisiae</i> dans la réplication des télomères et autres régions du génome afin de réprimer la réponse aux dommages à l'ADN (DDR) .....	33
Figure 1.6 Représentation schématique des différents niveaux d'activité de Cdc28, des cyclines et des inhibiteurs de Cdc28, les CKIs, dans les différentes phases du cycle cellulaire de la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	40
Figure 1.7 Schéma des niveaux protéiques des cyclines (Cln1-3 et Clb1-6) dans les différentes phases du cycle cellulaire .....	47
Figure 1.8 Représentation schématique expliquant les changements dans la spécificité de Cdk1 envers différents substrats durant le cycle cellulaire .....	55

### CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

Figure 2.1 Présentation schématique des étapes de la technique de croisement .....	61
------------------------------------------------------------------------------------	----

Figure 2.2 Représentation schématique d'une courbe divisée dans 5 intervalles de temps égaux et où les valeurs de densité optique sont représentées par les variables $y_n$ dans le but de calculer l'aire sous la courbe .....	63
Figure 2.3 Tests de croissance sur milieu solide par la technique «spot test» .....	65
Figure 2.4 Récolte d'échantillons suite à la déprotection des télomères .....	66
Figure 2.5 Représentation schématique simplifiée de la quantification des signaux à partir des images numériques prises par le phosphorimager Typhoon FLA 9500 .....	71

### CHAPITRE 3 : RÉSULTATS

Figure 3.1 Effet de délétion des cyclines de la phase S précoce sur la croissance .....	78
Figure 3.2 Quantification de l'ADN simple brin dans les mutants de cyclines précoces de la phase S .....	83
Figure 3.3 La phosphorylation de la protéine Rad53 dans la souche <i>cdc13-1</i> n'est pas empêchée par la délétion des <i>CLB5</i> et <i>CLB6</i> .....	85
Figure 3.4 Évaluation de l'arrêt en G <sub>2</sub> /M dans les cellules mutantes des cyclines précoces de la phase S .....	86
Figure 3.5 Effet de la délétion de cyclines Clb3 et Clb4 sur la croissance, sur le niveau de simple brin et sur l'activation de la DDR dans les cellules <i>cdc13-1</i> .....	88
Figure 3.6 Effet de doubles délétions de cyclines de la phase S sur la croissance et sur le niveau de simple brin des cellules <i>cdc13-1</i> .....	90
Figure 3.7 Effet de triples délétions de cyclines de la phase S sur la croissance et sur le niveau de simple brin des cellules <i>cdc13-1</i> .....	92
Figure 3.8 Activation de la réponse aux dommages à l'ADN suite à la déprotection des télomères dans les mutants contenant une triple délétion de cyclines .....	93
Figure 3.9 Comparaison entre l'effet sur la croissance et le niveau d'ADN sb des deux clones <i>cdc13-1 clb3,4,5Δ</i> .....	95

Figure 3.10 La cinétique de dégradation de la protéine Clb5 suite à la suppression de l'expression de GAL-CLB5 en présence du glucose .....	98
Figure 3.11 Tests de croissance confirmant que la construction GAL-CLB5 est fonctionnelle .....	99
Figure 3.12 Évaluation d'effet de la délétion des S cyclines sur la résection et la viabilité après la déprotection des télomères .....	102
Figure 3.13 Évaluation d'effet de la délétion des S cyclines sur la résection et l'activation de la DDR en absence de division .....	104

#### **CHAPITRE 4 : MODIFICATION ET ADAPTATION DE LA TECHNIQUE QAOS À L'UTILISATION DU SYBR Green**

Figure 4.1 La deuxième étape de la détection de l'ADN simple brin par la qPCR Taqman .....	108
Figure 4.2 Les différentes étapes de la technique QAOS ( <i>Amplification quantitative de l'ADN simple brin par PCR</i> ) et les différents loci présents sur le chromosome V du bras droit (R) .....	111
Figure 4.3 L'effet du tampon NIB et du traitement à la Protéinase K sur la qualité d'échantillons et la quantification de l'ADN sb par QAOS .....	117
Figure 4.4 Effet de la correction du mélange réactionnel sur l'efficacité de l'expérience QAOS .....	120
Figure 4.5 Quantification du % simple brin par QAOS .....	122

# CHAPITRE 1

## INTRODUCTION

### 1.1 LES TÉLOMÈRES

Les extrémités des chromosomes linéaires eucaryotes ont été décrites pour la première fois par H. J. Muller et B. McClintock chez la drosophile et le maïs, respectivement. Dès 1938, Muller a pu démontrer que les extrémités des chromosomes interagissaient rarement avec les extrémités de cassures induites par des radiations (Muller, 1938). Ainsi, il proposa que les extrémités des chromosomes possèdent une structure particulière, qu'il nomma «télomère» à partir des mots grec *telos* (fin) et *mere* (segment). Il définissait alors les télomères non pas comme une extrémité physique, mais comme un gène terminal ayant une fonction particulière à l'extrémité du chromosome. Dans un même temps, McClintock, qui observait le devenir de cassures d'ADN double brin (CDB) induit par radiation durant la division méiotique, a pu démontrer que les extrémités des chromosomes «cassés» fusionnent régulièrement avec les chromatides sœurs, menant à des cycles de cassures/fusions/ponts presque toujours associés à des pertes de séquences télomériques au niveau des points de jonction (McClintock, 1939). Ainsi, elle distingue les chromosomes altérés des chromosomes normaux selon l'existence ou non de cycles d'instabilité. Les travaux de Muller et de McClintock suggèrent que les extrémités de chromosomes altérées ressemblent à des CDB et que des mécanismes essentiels permettant la distinction entre CDB et télomères. Ainsi, l'absence d'un tel mécanisme ou une altération de la structure des télomères peuvent occasionner à des fusions, des pertes ou gains de télomères et d'échanges réciproques ou non entre ces séquences, qui conduisent à des cycles d'instabilité génomique. Ainsi, dès le début du siècle, les extrémités des chromosomes sont jugées indispensables au maintien de l'intégrité des chromosomes.

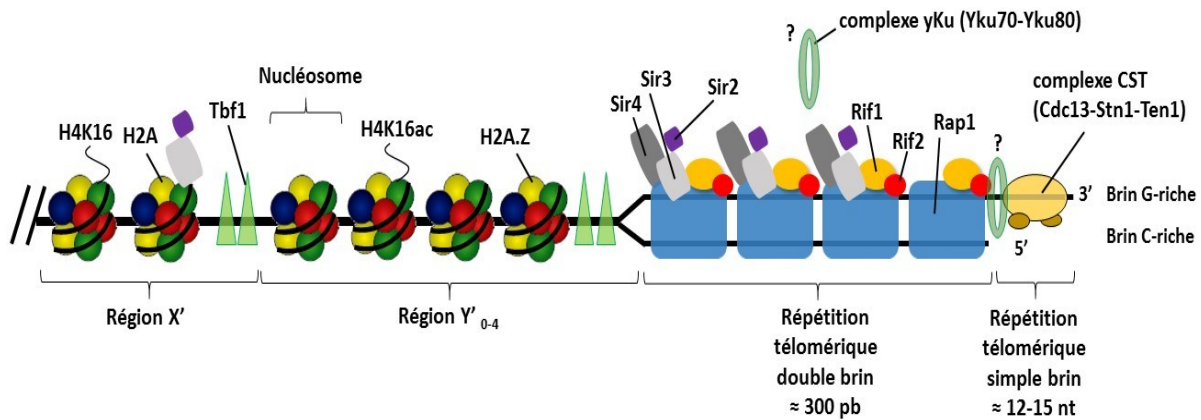


Les télomères sont des structures nucléoprotéiques, localisées à l'extrémité des chromosomes eucaryotes linéaires, composées de séquences répétées d'ADN particulières et leurs protéines associées. Leur rôle principal et indispensable est de permettre aux cellules de pouvoir distinguer entre les extrémités naturelles des chromosomes et des extrémités d'ADN provenant d'une CDB, qui sont normalement soumis à la réparation par recombinaison homologue (RH) ou à la jonction des extrémités non-homologue (JENH). Ainsi, l'organisation fonctionnelle des télomères à l'aide de complexes protéiques (la coiffe ou le capuchon télomérique) assurerait une protection contre des événements de recombinaison inappropriés ou d'éventuelles dégradations par la suppression de ces deux voies de réparation d'ADN au niveau des extrémités chromosomiques. Cette fonction de protection aussi permet d'empêcher l'activation des points de contrôle ou «checkpoints» qui détectent des cassures de l'ADN (Sandell et Zakian, 1993). De plus, les télomères possèdent d'autres fonctions importantes dans plusieurs processus, comme la réplication des extrémités chromosomiques, l'organisation spatiale du noyau, la ségrégation des chromosomes, la recombinaison méiotique, la régulation de l'expression de gènes proximaux et servent de source de l'ARN télomérique intervenant à de nombreux aspects de la biologie des télomères (Wellinger et Zakian, 2012 ; Azzalin et Lingner, 2015). Bien que les fonctions principales des télomères soient conservées, la structure, la taille et la nature des séquences télomériques varient entre les espèces. Chez les mammifères, les télomères sont constitués de motifs répétés en tandem TTAGGG dont le nombre varie selon les organismes. Ces séquences présentent une taille allant de 5 à 15 kilobases (kb) chez l'homme et jusqu'à 80 kb dans certaines souches de souris (Morin, 1989 ; Moyzis *et al.*, 1988 ; Zijlmans *et al.*, 1997).

### **1.1.1 La structure et composition des télomères chez *Saccharomyces cerevisiae***

La structure de l'ADN télomérique est assez bien conservée chez les différentes espèces d'eucaryotes étudiées jusqu'à présent. L'ADN terminal des chromosomes est composé de séquences courtes répétées qui sont riches en guanine/cytosine (G/C). Le brin 5' vers 3' à partir

du centromère se nomme le brin G-riche, puisqu'il est riche en guanine (figure 1.1). Ainsi, le brin 3' vers 5' à partir du centromère se nomme le brin C-riche (figure 1.1). Les répétitions télomériques sont bicaténares, à l'exception de l'extrémité terminale 3' du brin G-riche, qui possède une extension sous forme simple brin (figure 1.1). La longueur de cette extrémité simple brin varie aussi selon les espèces. Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, les télomères sont constitués de répétitions télomériques, d'éléments sous-télomériques et de complexes protéiques. Les répétitions télomérique sont composées de  $300 \pm 75$  paires de base (pb) de répétitions double brin hétérogènes, ainsi que d'une extension 3' simple brin riche en G (figure 1.1). En amont des répétitions télomériques double brin, on retrouve des séquences associées aux télomères (TAS pour *Telomere Associated Sequences*) aussi connus sous le nom des éléments sous-télomériques. Chez *S. cerevisiae*, les séquences sous-télomériques sont composées de deux classes d'éléments: les éléments X et Y' (Chan et Tye, 1983a ; Chan et Tye, 1983b ; figure 1.1). Les éléments X sont présents sur tous les télomères, tandis que les Y' se retrouvent sur la moitié des extrémités chromosomiques. À la différence des séquences télomériques, les séquences sous-télomériques sont fréquemment soumises à la recombinaison et, en conséquence, elles sont constituées de motifs répétés plus variés. Ces séquences sont peu conservées durant l'évolution (Chan et Tye, 1983a ; Chan et Tye, 1983b). Les régions sous-télomériques contiennent des séquences consensus ARS (pour *Autonomously Replicating Sequences*) constituant des origines de réplication pour le télomère et l'ADN dans ces régions est organisé sous forme de la chromatine (Wright *et al.*, 1992). De courtes séquences télomériques intervenantes se trouvent entre les éléments sous-télomériques (ITS) (Walmsley, 1984). Les régions sous-télomériques sont décrites en détail dans la section 1.1.1.2.



**Figure 1.1 Représentation schématique de la structure et de la composition en complexes protéiques des télomères chez *Saccharomyces cerevisiae*.**

Chacune des différentes régions des télomères est liée par différents complexes protéiques essentiels et conservés, représentés dans la figure 1.1. Au niveau de l'extension simple brin, on retrouve le complexe CST, composé des protéines Cdc13, Stn1 et Ten1. Les répétitions télomériques double brin sont liées par le complexe protéique Rap1-Rif1-Rif2. Finalement, le complexe yKu (YKu70-YKu80) est localisé à la jonction de l'ADN double brin et simple brin télomérique et/ou associé par interactions avec le complexe Sir au niveau des séquences télomériques double brin. (Martin *et al.*, 1999 ; Roy *et al.*, 2004 ; Lopez *et al.*, 2011 ; figure 1.1). Les complexes protéiques énumérés ci-haut ainsi que les régions qu'ils lient sont décrits plus en détail dans la prochaine section.

De plus, au niveau des répétitions télomériques double brin, on retrouve aussi la famille de protéines Sir - Sir2, Sir3 et Sir4 (Sir pour *Silent Information Regulator* ; figure 1.1). Ses protéines sont connues pour jouer un rôle dans l'inhibition transcriptionnelle des gènes situés près des télomères et dans la régulation de la longévité.

#### 1.1.1.1 Répétition télomérique

Les répétitions télomériques riches en nucléotides G/C représentent un trait conservé entre les différentes espèces d'eucaryotes étudiées à date. Aux régions les plus distales des chromosomes, chez la levure bourgeonnante, on distingue environ 300 pb de répétitions télomériques hétérogènes, respectant le motif 5'-TG<sub>2-3</sub>(TG)<sub>1-6</sub>-3' (plus communément dénommé TG<sub>1-3</sub>) (Walmsley *et al.*, 1984 ; Shampay *et al.*, 1984 ; Wang et Zakian, 1990). Le nombre de ces répétitions diminue à chaque division cellulaire. À l'aide d'une transcriptase inverse, nommée la télomérase (Greider et Blackburn, 1985), de nouvelles répétitions sont ajoutées à la fin de chaque phase S du cycle cellulaire afin que les répétitions télomérique d'environ 300 pb soient maintenues chez la levure. L'hétérogénéité des séquences télomériques chez *S. cerevisiae* s'explique par les divers positionnements de la matrice en ARN de la télomérase au niveau de l'extrémité 3' télomérique (Förstemann et Lingner, 2001). Cette hétérogénéité de l'ADN télomérique permet de faire la distinction entre l'ADN télomérique nouvellement synthétisé et l'ADN télomérique préexistant (Wang et Zakian, 1990 ; Teixeira *et al.*, 2004).

Comme vu précédemment, chez la plupart des espèces eucaryotes les extrémités télomériques ne sont pas franches, mais possèdent une extension 3' simple brin. Cette extension est non seulement essentielle pour la fonction de la télomérase qui ne peut ajouter de répétitions sur une extrémité franche (Lingner *et al.*, 1995), mais aussi pour la fixation d'une protéine de la coiffe télomérique nommée Cdc13 (Nugent *et al.*, 1996 ; Hughes *et al.*, 2000 ; figure 1.1). La protéine Cdc13 a été identifiée auparavant lors de criblages génétiques ciblés à l'identification de protéines intervenant dans la régulation du cycle cellulaire (Weinert et Hartwell, 1993 ; Garvik *et al.*, 1995). Ces études ont démontré le rôle de Cdc13 dans la stabilité génomique grâce à un allèle thermosensible, *cdc13-1*, générant la déprotection des télomères et entraînant le déclenchement d'un arrêt du cycle cellulaire en G<sub>2</sub>/M. Incubées à température non-permissive,

les levures possédant l'allèle *cdc13-1* subissent une dégradation importante du brin 5' riche en C de leurs télomères sur plusieurs kilobases par des activités nucléases (Garvik *et al.*, 1995).

Chez la levure bourgeonnante *S. cerevisiae*, une longueur de l'extension simple brin de 12 à 14 nucléotides (nt) dans des cellules en dehors de la phase S a été mesurée à l'aide d'un essai utilisant d'extension d'amorce (Larrivée *et al.*, 2004). Une autre approche se basant sur l'amplification de répétitions télomériques avant et après la destruction enzymatique de l'extension simple brin démontre qu'une grande partie des extrémités chromosomiques portent des queues G-riches de 5 à 10 nt (Soudet *et al.*, 2014). Ainsi, durant la majorité du cycle cellulaire les extensions simple brin sont assez courtes, mais peuvent atteindre 30 à 50 nt de long pour une courte durée de temps à la fin de la phase S et lors de la phase G<sub>2</sub> du cycle cellulaire (Wellinger *et al.*, 1993a ; Soudet *et al.*, 2014). L'augmentation transitoire de la queue G-riche n'est pas uniquement due à l'action de la télomérase, puisque cette dynamique est conservée même dans les cellules qui ne possèdent pas une télomérase active (Wellinger *et al.*, 1996 ; Dionne et Wellinger, 1998). Les extensions G-riche sont formées par la dégradation du brin C-riche médiée par différentes nucléases (Bonetti *et al.*, 2009) et est contrôlée par l'activité de la principale kinase du cycle cellulaire, Cdc28 (Cdk1) (Frank *et al.*, 2006 ; Vodenicharov et Wellinger, 2006). Il a été démontré qu'une manière possible par laquelle l'activité de Cdc28 contribue à la création des queues G-riches est par la régulation de l'activité de certaines nucléases (Huertas *et al.*, 2008 ; Bonetti *et al.*, 2009 ; Chen *et al.*, 2011). De plus, la génération de ces extensions simple brin par l'activité des nucléases dépende et est obligatoirement précédée par la réplication semiconservative de l'ADN (Wellinger *et al.*, 1993a ; Dionne et Wellinger, 1998 ; Vodenicharov et Wellinger, 2006).

Le maintien des répétitions télomériques et de l'extrémité simple brin est crucial pour les deux fonctions principales des télomères, la réplication complète des chromosomes et leur protection.

Plusieurs protéines qui lient à l'ADN télomérique ont pour mission de protéger l'ADN terminal et d'assister dans les différentes fonctions télomériques.

#### **1.1.1.1.1 Les protéines du capuchon télomérique**

Comme énoncé plus haut, les extrémités des chromosomes linéaires sont protégées à l'aide d'une structure nucléoprotéique, appelée capuchon télomérique, qui permet aux cellules de faire la distinction entre une CDB et les télomères. Pour fournir une protection adéquate des chromosomes, la longueur des répétitions télomériques devrait être maintenue par la télomérase, ainsi que sa structure particulière, qui permet la fixation des protéines spécifiques de la coiffe télomérique.

Chez la levure bourgeonnante, la coiffe télomérique est composée des complexes protéiques suivants: CST (Cdc13-Stn1-Ten1), Yku (Yku70-Yku80) et Rap1-Rif1-Rif2. Il a été observé que la perte de fonction de l'un de ses complexes conduisait à la déprotection et à la déstabilisation des télomères. Les télomères décoiffés sont aperçus comme une des extrémités d'une CDB, ce qui mène à l'activation de la voie de réponse aux dommages à l'ADN (DDR pour *DNA Damage Response*). Cette voie est responsable du déclenchement des mécanismes de la réparation d'ADN et l'activation de l'arrêt du cycle cellulaire. Les voies de réparation de CDB, une fois activées au niveau des télomères déprotégés, résultent à des conséquences indésirables comme la dégradation des extrémités chromosomiques, la recombinaison élevée ou la fusion des extrémités, ce qui nuit à la stabilité génomique. Ainsi, l'inhibition de la DDR est une caractéristique remarquable et essentielle de la coiffe télomérique (Lydall, 2009 ; Wellinger, 2010). Cette propriété unique des télomères est assurée par la structure des télomères très conservée et des complexes protéiques ayant des fonctions analogiques à travers les espèces.

Dans les prochaines sous-sections, nous allons nous familiariser davantage sur les complexes protéiques du capuchon télomérique chez la levure bourgeonnante: le complexe Rap1-Rif1-Rif2, le complexe Yku et le complexe CST.

#### **1.1.1.1.1 Le complexe Rap1-Rif1-Rif2**

La protéine Rap1 (pour *Repressor Activator Protein1*) a été initialement découverte chez la levure par David Shore et Kim Nasmyth pour sa capacité de réprimer ou activer l'expression génique (Shore et Nasmyth, 1987). Sa capacité de reconnaître des séquences hétérogènes et de se lier à de nombreux endroits permet à Rap1 d'effectuer ses fonctions dans la répression et l'activation de la transcription de différents gènes. C'est pourquoi un faible pourcentage de cette protéine qui est très abondante, environ 10%, est lié aux télomères (Buchman *et al.*, 1988 ; Lieb *et al.*, 2001). Par contre, Rap1 possède une haute affinité aux répétitions télomériques double brin *in vitro* et se fixe environ à tous les vingt nucléotides (Ray et Runge, 1999 ; Gilson *et al.*, 1993). Ainsi, il y a environ 15 à 20 sites potentiels de fixation pour Rap1 par télomère individuel (Wright et Zakian, 1995). De plus, la présence de Rap1 aux télomères des cellules vivantes a été démontrée par immunocytochimie et immunoprécipitation de chromatine (Conrad, 1990 ; Lustig, 1990 ; Wright et Zakian, 1995 ; Gotta, 1996). La protéine Rap1 est composée de trois domaines: les domaines N-terminal, central et C-terminal. La délétion du domaine N-terminal est bien tolérée et n'impacte pas la croissance cellulaire (Graham *et al.*, 1999). La partie centrale est essentielle puisqu'elle permet la fixation de Rap1 à l'ADN double brin grâce à la présence d'un double domaine Myb. Ce domaine est essentiel à toutes les fonctions de Rap1 dans la cellule et sa délétion est létale pour la levure (Graham *et al.*, 1999). Enfin, la partie C-terminal de Rap1 est primordiale pour ses fonctions aux télomères ainsi que ses fonctions de silençage de la chromatine dans la régulation génique par le recrutement des protéines Sir3 et Sir4 (Moretti *et al.*, 1994) qui participent aux processus de répression de l'expression génique au niveau des télomères, aussi appelé TPE (pour *Telomere Position Effect*). Le domaine C-terminal permet

aussi le recrutement des protéines Rif1 et Rif2 (pour *Rap1 Interacting Protein*), qui sont importantes pour la régulation de la télomérase (Hardy *et al.*, 1992 ; Marcand *et al.*, 1997 ; Wotton et Shore, 1997). La délétion de *rif1* ou *rif2*, ou encore l'utilisation d'un allèle non létal de Rap1 possédant sa partie C-terminale tronquée (*rap1-17*) entraîne un allongement des séquences télomériques à plus de 2 à 4 kb (Kyrion *et al.*, 1992 ; Sussel et Shore, 1991). La structure cristalline des Rif1/2 liées à la protéine Rap1 a révélé que Rif1 et Rif2 possèdent des sites d'interaction indépendants dans le domaine C-terminal de Rap1, permettant de relier les molécules individuelles de Rap1 à grande distance (Shi *et al.*, 2013). Cette étude a identifié les domaines dans Rif1 et Rif2 permettant la tétramérisation de Rif1 et la polymérisation de Rif2, ainsi stabilisant la liaison de Rap1 aux répétitions télomériques et reliant les molécules voisines de Rap1 pour établir la structure de la coiffe télomérique.

Finalement, le complexe Rap1-Rif1-Rif2 est important pour la protection des télomères de manière indépendante de la réplication d'ADN, contrairement à la fonction protectrice du complexe CST. Rap1 et sa protéine associée, Rif2, sont plus nécessaires à l'inhibition de fusions des télomères par des mécanismes de réparations comme la JENH (Marcand *et al.*, 2008), ainsi que la suppression de la résection excessive des extrémités (Bonetti *et al.*, 2010 ; Vodenicharov *et al.*, 2010). Rap1 et Rif2 sont connus pour avoir un rôle à empêcher l'association du complexe Tel1 / MRX aux télomères (Hirano *et al.*, 2009 ; Bonetti *et al.*, 2010 ; Fukunaga et Sugimoto, 2012 ; Fukunaga *et al.*, 2012). Le complexe hétérotrimérique de MRX, composé des protéines Mre11, Rad50 et Xrs2, sert à la fois dans la reconnaissance des cassures double brin et dans l'activation de la DDR (Boulton et Jackson, 1998 ; Nugent *et al.*, 1998 ; Ritchie et Petes, 2000 ; D'Amours et Jackson, 2001 ; Grenon *et al.*, 2001). D'autre part, il a été observé que Rif1 est important à maintenir la viabilité des cellules *cdc13-1* (Addinall *et al.*, 2011 ; Anbalagan *et al.*, 2011). L'ensemble de ses résultats suggère que les protéines Rif1 et Rif2 sont distinctes et spécifiques dans la protection des extrémités des chromosomes.



#### 1.1.1.1.2 Le complexe Yku

Le complexe hétérodimérique Ku, Yku chez la levure, est composé de deux protéines Yku70 et Yku80 et s'agit d'un second complexe faisant partie de la coiffe télomérique (Boulton et Jackson, 1996 ; Porter *et al.*, 1996 ; figure 1.1). C'est un complexe essentiel dans la reconnaissance et la réparation des CDB par la JENH. Son implication aux télomères n'est pas à première vue évidente, étant donné son rôle connu aux télomères dans la suppression de cette voie de réparation des CDB. Yku semble se lier aux extrémités télomériques soit par fixation directe à l'ADN, de la même manière que le complexe se lie aux extrémités des CDB, ou bien par association indirecte à la chromatine aux régions sous-télomériques par sa capacité d'interagir avec la protéine Sir4 (Martin *et al.*, 1999 ; Roy *et al.*, 2004).

Le complexe Yku est requis pour des fonctions très variées aux télomères, incluant leur localisation adéquate au niveau de la périphérie nucléaire, leur protection contre la dégradation et la recombinaison, la répression de l'expression de gènes situés près du télomère, le recrutement de la télomérase et la régulation d'ajout d'un nouveau télomère suite aux cassures d'ADN (Fisher et Zakian, 2005). La protéine Yku80 s'associe avec la composante ARN de la télomérase, une interaction possiblement impliquée dans le recrutement de la télomérase aux télomères (Peterson *et al.*, 2001 ; Stellwagen *et al.*, 2003 ; Fisher *et al.*, 2004) ou dans le transport intracellulaire de la télomérase (Gallardo *et al.*, 2008 ; Gallardo *et al.*, 2011). D'autre part, le complexe Yku est aussi impliqué dans le maintien des répétitions télomériques puisque la délétion d'un de ces membres conduit au raccourcissement des télomères et l'accumulation d'ADN simple brin (Porter *et al.*, 1996 ; Boulton et Jackson, 1996 ; Gravel *et al.*, 1998). En effet, la délétion *yku* entraîne la formation d'une longue extension 3' simple brin pouvant atteindre environ 100 pb aux extrémités télomériques tout le long du cycle cellulaire, ainsi démontrant le rôle du complexe Yku dans la protection des extrémités des chromosomes contre l'activité des nucléases (Gravel *et al.*, 1998). Plus précisément, ce complexe bloque les

nucléases durant la phase G1 et constitue une voie parallèle et indépendante de la fonction du complexe CST dans la suppression de la dégradation des télomères (Vodenicharov et Wellinger, 2007 ; Bonetti *et al.*, 2010 ; Vodenicharov *et al.*, 2010).

#### 1.1.1.1.3 Le complexe CST

La queue simple brin G-riche est liée par le complexe CST, qui est composé de trois protéines essentielles: Cdc13, Stn1 et Ten1. Ce complexe est impliqué dans la protection et la réplication des télomères (Steinberg-Neifach et Lue, 2015 ; Churikov *et al.*, 2013). La protéine Cdc13 reconnaît et lie une séquence de répétitions télomériques simple brin d'au moins 11 nt *in vitro* (Lin et Zakian, 1996 ; Nugent *et al.*, 1996 ; Hughes *et al.*, 2000 ; figure 1.1). Le domaine de liaison à l'ADN de Cdc13 est situé au centre de la protéine et permet sa fixation sur un oligonucléotides riche en G de 11 nt (Hughes *et al.*, 2000 ; Mitton-Fry *et al.*, 2000). Malgré que la protéine Cdc13 s'associe aux télomères *in vivo* (Bourns *et al.*, 1998 ; Tsukamoto *et al.*, 2001), son association est limitée à une minorité d'extrémités chromosomiques, une observation qui a été faite par une étude récente qui a pu démontrer que les extensions simple brin mesure moins de 10 nt sur la majorité des télomères (Soudet *et al.*, 2014). Cette proposition corrèle avec d'autres études suggérant que la présence et le rôle de Cdc13 dans la protection des télomères ne sont nécessaires que lors de la réplication des télomères qui a lieu à la fin de la phase S/G<sub>2</sub> (Vodenicharov et Wellinger, 2006 ; Vodenicharov et Wellinger, 2007 ; Vodenichrov *et al.*, 2010). Tout comme Cdc13, Stn1 et Ten1 ont la capacité de se lier à l'extension 3' simple brin, mais avec moins d'affinité (Grandin *et al.*, 1997 ; Grandin *et al.*, 2001 ; Gao *et al.*, 2007). Stn1 et Ten1 montrent beaucoup de similarités avec Rpa2 et Rpa3, deux sous-unités du complexe RPA (pour *Replication Protein A*), qui s'associe aux télomères et est essentiel à la réplication semiconservative (Gao *et al.*, 2007). La similitude structurale entre les complexes CST et RPA a mené à la proposition que le complexe CST représente un complexe RPA spécialisé (t-RPA, pour *telomeric-RPA*) responsable de la réplication de l'ADN télomérique (Gao *et al.*, 2007 ;

Sun *et al.*, 2009 ; Gelinas *et al.*, 2009). Lorsque Stn1 et Ten1 sont surexprimées, elles peuvent outrepasser la perte de la fonction essentielle de Cdc13 dans une souche *cdc13-1* et ainsi restaurer la viabilité (Petreaca *et al.*, 2006 ; Petreaca *et al.*, 2007). D'autres études où la stœchiométrie des composants du CST a été altérée démontrent que Stn1 et Ten1 contribuent à la protection indépendamment de Cdc13 (Xu *et al.*, 2009 ; Holstein *et al.*, 2014).

La partie N-terminale de Cdc13 contient un domaine, nommé domaine de recrutement (DR), qui interagit avec Est1, une des sous-unités de la télomérase (Nugent *et al.*, 1996 ; Pennock *et al.*, 2001 ; Wu et Zakian, 2011) ou avec la protéine Stn1, suggérant que Stn1 et Est1 rentrent en compétition pour la liaison avec Cdc13 (Chandra *et al.*, 2001). Ces interactions mutuellement exclusives régulent la stabilité de l'association de la télomérase avec Cdc13 (Chandra *et al.*, 2001 ; Blackburn, 2001 ; Puglisi *et al.*, 2008 ; DeZwaan *et al.*, 2009). La protéine Cdc13 sert d'une plateforme d'interaction soit avec la télomérase, soit avec les membres du complexe CST, régulant ainsi l'accès de la télomérase aux télomères de manière, respectivement, positive ou négative. Pour effectuer ces fonctions de façon optimale, le DR de Cdc13 semblerait subir des modifications post-traductionnelles, telles que la phosphorylation et la SUMOylation. Des sites spécifiques de phosphorylation des kinases Cdc28 (Li *et al.*, 2009 ; Tseng *et al.*, 2009) et Mec1/Tell1 (Tseng *et al.*, 2006) ont été identifiés au niveau du DR de Cdc13, bien que ces dernières modifications concernant les kinases de type Pi3K soient discutables actuellement (Wu *et al.*, 2013 ; Gao *et al.*, 2010). Ces modifications étant importantes pour le recrutement de la télomérase, sont renversées plus tard par l'action de la phosphatase PPA2 et la kinase Aurora qui aident à la dissociation de la télomérase en G<sub>2</sub> après la synthèse (Shen *et al.*, 2014). De plus, la phosphorylation par Cdc28 a été récemment impliquée dans la stabilisation du complexe CST par la modification de la protéine Stn1, qui modifie l'équilibre vers l'inhibition de l'action de la télomérase (Liu *et al.*, 2014). La SUMOylation de Cdc13, une autre modification par l'attachement d'une petite protéine appelée SUMO, a été également impliquée dans la régulation de la télomérase et la longueur des télomères (Hang *et al.*, 2011).

Les protéines Cdc13 et Stn1 du complexe CST ont la capacité d'interagir aussi avec la machinerie de réplication semiconservative. La partie N-terminale de Cdc13 permet sa dimérisation ainsi que sa liaison à Pol1, la sous-unité catalytique de l'ADN polymérase  $\alpha$ , tandis que le domaine C-terminal de Stn1 interagit avec Pol12, une autre sous-unité de l'ADN polymérase  $\alpha$ , qui effectue la synthèse du brin tardif (Qi et Zakian, 2000 ; Sun *et al.*, 2011 ; Grossi *et al.*, 2004). Ces études biochimiques et d'autres études génétiques (Adams et Holm, 1996 ; Parenteau et Wellinger, 1999 ; Adams Martin *et al.*, 2000) ont aidé d'avancer l'idée que le complexe CST joue un rôle important dans la synchronisation de la réplication semiconservative et l'ajout de répétitions par la télomérase aux télomères.

#### **1.1.1.2 Séquences associées aux télomères (TAS)**

Les séquences associées aux télomères sont des régions répétées représentées par deux classes de séquences: les éléments sous-télomériques X et Y' (Chan et Tye, 1983 ; figure 1.1). La présence de séquences associées aux télomères est une caractéristique hautement conservée entre les espèces. Chez *S. cerevisiae* il peut y avoir 0 à 4 régions Y' sur chaque extrémité des chromosomes. En effet, environ deux tiers des extrémités des chromosomes de la levure possèdent au moins une séquence Y' (Chan et Tye, 1983). À cause des multiples petites insertions et délétions dans la séquence de l'élément Y', cette région est présente dans deux différentes tailles: Y' longue (6,7kb) et Y' courte (5,2kb) (Chan et Tye, 1983). Un seul élément X, plus hétérogène en séquence et de taille que les Y', est située à chaque extrémité chromosomique et se retrouve toujours en amont des régions Y' (figure 1.1). Des répétitions télomériques internes (ITS) se trouvent entre les régions sous-télomériques X-Y' et Y'-Y' (Walmsley *et al.*, 1984). Des répétitions TTAGGG sont aussi retrouvées au sein des séquences sous-télomériques Y' et X (Louis et Haber, 1992) et sert de site de liaison pour le facteur de transcription Tbf1p (Brigati *et al.*, 1993 ; Koering *et al.*, 2000 ; figure 1.1). Tbf1p est connu pour permettre le recrutement de la télomérase (Arneric et Lingner, 2007), mais également

fournit une fonction de protection de la coiffe télomérique par sa capacité de dépasser la fonction protectrice de Rap1 dans des souches où les répétitions télomériques de levure ont été remplacées avec celles d'homme (Alexander et Zakian, 2003 ; Ribaud *et al.*, 2012 ; Fukunaga *et al.*, 2012). Bien que la levure peut maintenir la division mitotique normale et de passer la méiose sans aucune difficulté en absence des éléments X et/ou Y' sous-télomériques, ce n'est pas le cas lors de la délétion complète des répétitions télomériques qui est associée avec une perte très fréquente du chromosome affecté (Sandell et Zakian, 1993 ; Wellinger et Zakian, 2012).

Contrairement aux répétitions télomériques normalement dépourvues de nucléosomes, la chromatine au niveau des régions sous-télomériques adopte une organisation sous forme de nucléosomes (Wright *et al.*, 1992). Les deux régions sous-télomériques, X et Y', portent des modifications post-traductionnelles et des variantes d'histones distinctes. Les séquences X se comportent comme des régions géniques réprimées, caractérisées par l'absence d'acétylation sur la lysine 16 de l'histone H4 (H4K16) (Zhu et Gustafsson, 2009 ; figure 1.1). Par conséquent, la protéine Sir2, une H4K16 désacétylase recrutée par le complexe Rap1, et la protéine Sir3, occupant souvent des régions de hétérochromatine, sont également enrichies dans la région X (Zhu et Gustafsson 2009 ; Imai *et al.*, 2000 ; figure 1.1). L'organisation de la chromatine des régions X est similaire pour les extrémités chromosomiques portant un seul élément X tout comme ceux qui possèdent des éléments X et Y' (Takahashi *et al.*, 2011). Contrairement aux séquences X, aux régions Y' le H4K16 est acétylé de manière similaire à l'euchromatine et les protéines Sir y sont absentes (Zhu et Gustafsson, 2009 ; Takahashi *et al.*, 2011 ; figure 1.1). De plus, ces régions sous-télomériques possèdent l'histone H2A phosphorylée, une marque typiquement présente au site de dommages à l'ADN, mais sa fonction aux télomères reste inconnue (Kim *et al.*, 2007 ; Szilard *et al.*, 2010). À certains endroits dans les régions sous-télomériques, on retrouve un variant d'histone H2A, H2A.Z, souvent présente aux promoteurs actifs, possiblement participant à la formation de frontière entre hétérochromatine et euchromatine (Guillemette *et al.*, 2005 ; Albert *et al.*, 2007 ; figure 1.1) .

### 1.1.2 La réplication des télomères chez *Saccharomyces cerevisiae*

La réplication de l'ADN est l'évènement qui permet à la cellule d'obtenir, en vue de la division cellulaire, une seconde copie de son génome pendant la phase de synthèse (S) du cycle cellulaire. Chez *S. cerevisiae* ce processus nécessite des sites ARS situés à tous les 40 à 100kb du chromosome, à partir desquelles la synthèse de l'ADN se déroule de manière bidirectionnelle (Raghuraman *et al.*, 2001 ; Poloumienko *et al.*, 2001). Puisque les séquences d'ARS ne sont pas assez similaires, un des premiers défis concernant l'étude sur la réplication des télomères a été de trouver les ARS responsables de leur réplication. Les séquences sous-télomériques X et Y contiennent des ARS susceptibles de fonctionner comme origine pour la réplication des télomères, bien que les ARS contenus dans les séquences X semblent être inactifs (Makovets *et al.*, 2004 ; Stevenson et Gottschling, 1999 ; Poloumienko *et al.*, 2001).

La réplication semiconservative de l'ADN télomérique est l'un des derniers événements de la phase S chez la levure bourgeonnante. Cette réplication tardive est due principalement à un effet de positionnement négative exercé par les télomères sur l'activation des origines proximaux (Ferguson et Fangman, 1992 ; Wellinger *et al.*, 1993a), programmée assez tôt pendant la phase G1 (Raghuraman *et al.*, 1997). Différents facteurs contrôlent l'activation tardive des ARS près des télomères. La longueur des télomères peut affecter l'activation des origines de réplication, puisque l'effet inhibiteur sur les ARS télomériques est perdu près d'un télomère court. En effet, ces ARS sont activés plus tôt durant la phase S en comparaison avec les ARS placés près d'un télomère de longueur normale (Bianchi et Shore, 2007a). La suppression de Rif1, qui aide dans l'augmentation de la taille des télomères, résultait dans l'activation précoce de la réplication aux télomères (Lian *et al.*, 2011). La fonction de Rif1 dans l'inhibition de l'activation des origines près des télomères est médiée par son interaction avec la protéine phosphatase PP1, produit du gène essentiel *GLC7* (Hiraga *et al.*, 2014 ; Dave *et al.*, 2014 ; Mattarocci *et al.*, 2014). La PP1 recrutée aux origines près des télomères par Rif1 contrebalance

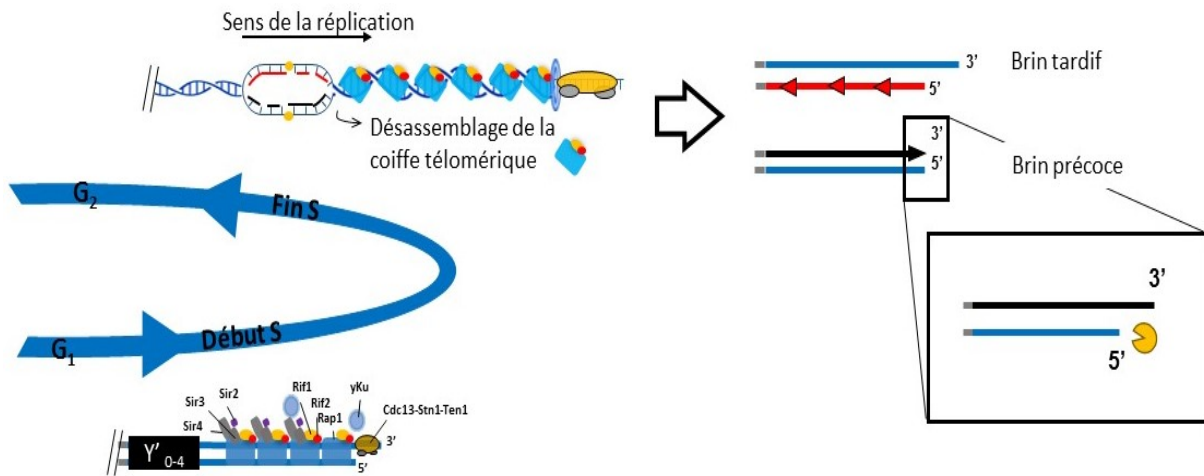
l'activité de la kinase DDK (*Dbf4-dependent kinase*) qui est nécessaire pour la phosphorylation et l'activation de l'hélicase répliquative MCM. Ce mécanisme peut opérer en concert avec d'autres sorts de régulation, par exemple, l'architecture ou l'accessibilité de la chromatine alentour des origines de réplication. Dans ce sens, des cellules déficientes en Sir3, une protéine impliquée dans l'établissement de l'hétérochromatine et dans le TPE, ne manifestent pas de changements importants dans le temps d'activation des ARS près des télomères (Stevenson et Gottschling, 1999), ce qui suggère que la structure de la chromatine a un effet mineur sur l'activation tardive des origines de réplication près des télomères. En revanche, l'absence du complexe Yku, qui entraîne un repositionnement des télomères dans l'espace nucléaire et leur raccourcissement, résulte dans l'activation précoce des origines de réplication aux télomères (Cosgrove *et al.*, 2002).

Compte tenu de leur position distale, lors de la réplication des chromosomes, les télomères sont condamnés de raccourcir après chaque division cellulaire. En effet, James D. Watson avait prédit l'existence du problème de la réplication terminale, *the end replication problem* (Watson, 1972). Par la suite, Olovnikov avait formulé une théorie présentant le problème de la réplication selon laquelle la perte progressive de l'ADN télomérique constituerait une horloge biologique qui déterminerait le vieillissement cellulaire. Le raccourcissement des chromosomes conduirait éventuellement à l'élimination de gènes essentiels, ce qui diminuerait la vitalité des cellules, jetant les prémices de la théorie du rôle des télomères dans le vieillissement cellulaire (Olovnikov, 1973). Selon ce modèle, la réplication incomplète des extrémités serait à l'origine du raccourcissement se produisant après chaque division cellulaire. Cette réplication incomplète s'explique par l'incapacité de l'ADN polymérase à synthétiser l'ADN aux extrémités linéaires, ou la dernière amorce d'ARN au niveau du brin tardif ne peut être convertie en ADN (figure 1.2). De plus, les bouts francs générés au niveau du brin précoce durant la réplication constituent un second aspect du problème de la réplication, puisque la restauration de la queue simple brin et la structure normale de l'ADN terminal requièrent un raccourcissement supplémentaire de l'extrémité 5'. Ce modèle allait susciter un certain intérêt qui n'aura été réellement démontré

que quelques dizaines d'années plus tard (Lingner *et al.*, 1995 ; Ohki *et al.*, 2001 ; Soudet *et al.*, 2014). On pense que le problème de la réplication terminale est en partie résolu par la télomérase (Lingner *et al.*, 1995).

En plus de la perte graduelle de l'ADN terminal, la réplication semiconservative peut poser d'autres complications aux télomères, puisque l'ADN télomérique constitue un obstacle pour les polymérases répliquatives. Par conséquent, un arrêt de la polymérase peut engendrer une réplication incomplète des extrémités ou la perte de gros morceaux d'ADN télomérique. Ce problème, observé chez différents organismes, est dû au ralentissement de la fourche de réplication au niveau des télomères à cause de la composition particulière riche en G/C des séquences télomériques (Ivessa *et al.*, 2002 ; Miller *et al.*, 2006 ; Sfeir *et al.*, 2009). Les séquences télomériques simple brin générées durant le passage de la fourche sont en mesure de se replier sur eux-mêmes, ce qui permet la formation de structures secondaires stables empêchant la progression de la polymérase à une vitesse optimale (Lopes *et al.*, 2011 ; Paeschke *et al.*, 2011). De plus, les origines de réplication inactives présentent dans les régions sous-télomériques, ainsi que certaines protéines télomériques fortement liées à l'ADN ralentissent la progression de la fourche. Prises ensemble, ces données suggèrent que la nature des séquences télomériques, ainsi que la structure de la chromatine aux télomères, contribuent à leurs effets négatifs sur la progression de la fourche de réplication.





**Figure 1.2 Représentation schématique de la réplication des télomères en fin de la phase S et la reconstitution de la structure habituelle du brin tardif par l'activité des nucléases.** La réplication des extrémités des chromosomes a lieu en fin de la phase S, à cause de l'activation tardive des origines de réplication (ARS). La réplication aux télomères nécessite le désassemblage de la coiffe télomérique. À la suite de la réplication des télomères, il est prédit que le brin précoce aura un bout franc. Cette structure n'étant pas la structure habituelle des télomères, il y aura une résection contrôlée de ce-dernier par l'activité des nucléases. Cette résection non-étendue permettra de fournir le substrat nécessaire à l'action de la télomérase.

La réplication qui s'effectue sur les deux brins d'ADN parentaux simultanément en partant d'une ARS, ne peut pas se faire de la même façon sur les deux brins (figure 1.2). Le brin parental orienté de 3' vers 5' à partir du centromère permet la synthèse directe du brin complémentaire à partir d'une seule amorce composée en ARN à partir d'une ARS. Ceci produira, par une synthèse continue, le brin précoce jusqu'au télomère générant une extrémité franche (Ohki *et al.*, 2001 ; Soudet *et al.*, 2014). La réplication du brin parental 5' vers 3' à partir du centromère ne peut pas se faire de façon continue, mais par la synthèse de plusieurs amorces d'ARN qui seront allongés dans le sens inverse de la progression de la fourche de réplication, ainsi formant de fragments courts, appelés fragments d'Okazaki. Ces fragments sont ensuite joints ensemble, la partie d'ARN est digérée et remplacée avec de l'ADN, formant ainsi un brin d'ADN nouvellement synthétisé, nommé le brin tardif. Au niveau du brin tardif, la machinerie répliquative conventionnelle ne permet pas la réplication complète du chromosome, à cause de la dégradation de la partie ARN du fragment d'Okazaki situé à l'extrémité des chromosomes,

et engendre une perte de séquences à chaque division cellulaire (figure 1.2). Ainsi, suite à la réplication conventionnelle, au niveau des extrémités issues de la synthèse du brin tardif, les extensions simple brin sont régénérées et leur taille correspond à celle de l'amorce d'ARN de 10 nt ou moins (Soudet *et al.*, 2014 ; Waga et Stillman, 1994). Au niveau des extrémités franches générées lors de la synthèse continue du brin précoce, le brin parental doit être raccourci en direction 5' vers 3' par des activités nucléases afin de rétablir l'extension simple brin en 3' (Wellinger *et al.*, 1993b ; Wellinger *et al.*, 1996 ; figure 1.2). La résection d'environ 30-40 nt de cette extrémité est suivie par le remplissage de la partie simple brin pour finalement recréer l'extension simple brin de près de 10 nt (Soudet *et al.*, 2014). Cette résection se déroule en fin de phase S et nécessite le passage de la fourche de réplication, ainsi que l'activité de la kinase Cdc28, suggérant qu'une déprotection temporaire des télomères permettront ces activités nucléases (Wellinger *et al.*, 1993b ; Dionne et Wellinger, 1998 ; Vodenicharov et Wellinger, 2006). À défaut de restaurer la queue simple brin, la cellule pourrait subir des conséquences, telles que la perte de la fixation de Cdc13 et la protection ou encore la perte de substrat servant à la télomérase de se lier et ajouter les répétitions télomériques. En effet, la télomérase n'est pas capable d'ajouter des répétitions télomériques sur une extrémité franche (Lee *et al.*, 1993). Il est donc essentiel pour la cellule de recréer cette extension simple brin afin de ne pas perdre la protection et les fonctions dans la réplication fournies par Cdc13, et de ne pas compromettre non plus la restauration de la longueur habituelle des télomères par l'ajout des répétitions télomériques effectué par la télomérase.

Le complexe MRX (Mre11-Rad50-Xrs2) a été identifié précocement comme pouvant participer à la résection des télomères au niveau du brin précoce. La délétion de n'importe lequel de ses composants entraîne un raccourcissement des télomères, ainsi suggérant qu'un parallèle existe entre la résection médiée par le complexe MRX et l'ajout de répétitions télomériques par la télomérase (Kironmai et Muniyappa, 1997 ; Boulton et Jackson, 1998 ; Nugent *et al.*, 1998). Malgré que la dynamique d'apparition des longues extensions 3' simple brin en fin de la phase S soit conservée dans des cellules *mre11Δ*, ces extensions sont en moyenne plus courtes que

ceux des cellules de type sauvage (Larrivée *et al.*, 2004). Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont démontré la fixation exclusive de Mre11 au niveau du brin précoce des télomères (Faure *et al.*, 2010). Ces études suggèrent un rôle pour le complexe MRX dans la résection des extrémités télomériques franches suite à la synthèse du brin précoce par la machinerie de réplication conventionnelle.

Pour tenter d'identifier d'autres activités nucléases, les études se sont concentrées sur des analyses de télomères déprotégés ou sur l'ajout de nouvelles séquences télomériques à partir d'une CDB, des systèmes plus faciles à étudier que les télomères natifs.

### **1.1.3 Les activités responsables de la formation des extensions 3' simple brin**

Comme mentionné ci-haut, la structure particulière des extrémités télomériques doit absolument être régénérée après le passage de la fourche de réplication, ce qui concerne surtout les extrémités franches du brin précoce. Le mécanisme de la régénération de cette structure et les facteurs impliqués ont été partiellement dévoilés par l'utilisation de constructions permettant la formation d'une nouvelle extrémité télomérique dans une cellule. Ces études permettent l'analyse des événements lors de la formation d'un nouveau télomère fonctionnel à l'aide d'un site de clivage pour l'endonucléase HO adjacent à de courtes répétitions télomériques (Diede et Gottschling, 1999). Les événements suivants la coupure par l'endonucléase HO et la formation d'un nouveau télomère (néotélomère) sont assimilés à ce qui se produit au niveau des extrémités télomériques natives, après le passage de la fourche de réplication. Le rôle de MRX dans la résection du brin 5' a pu être étudié grâce à cette construction. Il est ainsi confirmé que l'absence d'un des composants du complexe MRX se traduit par une perte d'ajout des répétitions télomériques, entraînée probablement par une perte de la résection du brin 5' riche en C (Diede et Gottschling, 2001). Cependant, l'ajout de néotélomères et la liaison de Cdc13 aux télomères

n'étaient pas compromis dans des souches déficientes pour l'activité nucléase de Mre11 (Tsukamoto *et al.*, 2001 ; Frank *et al.*, 2006), suggérant que l'activité nucléase du complexe MRX ne semble pas être nécessaire dans son action aux télomères néoformés. Plusieurs publications montrent que l'association du complexe MRX aux télomères est importante pour l'activité de la télomérase, ce qui pourrait expliquer l'absence d'ajout de néotélomères dans les mutants MRX. Le complexe MRX est connu pour recruter Tel1, une kinase de signalisation impliquée dans la DDR, via la sous-unité Xrs2 au niveau des CDB (Nakada *et al.*, 2003) et aux télomères (Hector *et al.*, 2007 ; Sabourin *et al.*, 2007). Le complexe MRX se fixe de façon préférentielle aux télomères courts (McGee *et al.*, 2010), tout comme Tel1 (Hector *et al.*, 2007 ; Sabourin *et al.*, 2007) et la télomérase (Goudsouzian *et al.*, 2006). De plus, le recrutement de la télomérase aux télomères courts semble être aboli par la délétion de Tel1 (Goudsouzian *et al.*, 2006 ; Arneric et Lingner, 2007). Ainsi, la délétion de Tel1 entraîne des télomères plus courts (Lustig et Petes, 1986 ; Greenwell *et al.*, 1995 ; Nakada *et al.*, 2003). À la lumière de ces résultats, en absence de MRX fonctionnel, l'ajout de néotélomères n'est pas aboli par une résection défectueuse, mais plutôt l'interaction entre MRX et Tel1, qui est cruciale pour l'action de la télomérase aux télomères courts, ne se produit pas. Cette interaction est régulée par des protéines télomériques en fonction de la longueur des télomères. En effet, la liaison de Tel1 aux télomères est régulée par la protéine Rif2 de la coiffe télomérique qui inhibe l'interaction entre Xrs2 et Tel1 (Hirano *et al.*, 2009). Aux télomères courts, la présence de Rif2, mais pas celle de Rif1, est diminuée, ce qui permet l'association plus stable de Tel1 (Hirano *et al.*, 2009 ; McGee *et al.*, 2010). Potentiellement, la stabilité accrue de la liaison de Tel1 modifierait la structure de la chromatine des télomères afin de les rendre accessibles à la télomérase. Malgré la suppression complète de l'ajout des télomères néoformés en l'absence de Tel1 ou de Mre11 (Diede et Gottschling, 2001 ; Frank *et al.*, 2006), les souches *tell1Δ* ou *mre11Δ* maintiennent leurs télomères natifs à une longueur courte, mais stable. De plus, certains allèles de *MRE11*, qui inhibent son activité nucléase *in vitro* et abolissent la formation de néotélomères *in vivo*, n'affectent pas la longueur ni la structure des télomères natifs (Frank *et al.*, 2006), ce que laisse entendre des différences importantes entre les télomères néoformés et les télomères natifs par rapport au traitement des bouts francs et au recrutement de la télomérase. Curieusement,

l'insertion des séquences sous-télomériques contenant des sites de liaison de la protéine Tbf1 en proximité du site d'ajout d'un néotélomère ou d'un télomère court permet de surmonter l'effet inhibiteur de la délétion de Tel1 (Arnerić et Lingner, 2007). Vraisemblablement, Tel1 et Tbf1 partagent une fonction redondante facilitant le recrutement ou l'activation de la télomérase au niveau des télomères courts. Certaines études suggèrent que cette fonction partagée implique une résection plus efficace par MRX, stimulée aux télomères par Tel1 (Martina *et al.*, 2012) ou par Tbf1, comme récemment observée au niveau des CDB (Bonetti *et al.*, 2013). Par contre d'autres travaux s'opposent à cette suggestion par le fait que Rap1 et Tbf1 inhibent la localisation de MRX aux télomères (Fukunaga *et al.*, 2012) et que la présence des séquences TTAGGG liées par Tbf1 près d'une coupure induite par l'endonucléase HO protège ces extrémités contre des activités nucléase (Ribaud *et al.*, 2012).

Toujours dans ce contexte de télomères néoformés, le complexe MRX permet l'initiation de la résection par le recrutement de Sae2, une protéine auxiliaire stimulant l'activité endonucléase de Mre11 (Cannavo et Cejka, 2014), de manière similaire aux CDB (Zhu *et al.*, 2008 ; Mimitou et Symington, 2008 ; Bonetti *et al.*, 2009). La protéine Sae2 est la seule cible de Cdc28 confirmée à date d'agir dans la résection des télomères (Huertas *et al.*, 2008). Dans une certaine mesure, MRX permet aussi la résection plus profonde du brin 5' C-riche aux télomères par d'autres nucléases, comme Sgs1/Dna2 ou Exo1, de manière indépendante de Sae2 (Bonetti *et al.*, 2009). Ainsi la formation des extensions 3' simple brin aux télomères néoformés, entraîne deux niveaux de dégradation, une résection initiale et une résection extensive, comme ce qui a été observé au niveau des CDB (Zhu *et al.*, 2008 ; Mimitou et Symington, 2008 ; Nicolette *et al.*, 2010 ; Mimitou et Symington, 2010).

Malgré que l'ajout de néotélomères est complètement aboli par la délétion simultanée de *SAE2* et *SGS1*, les mutants *sae2 sgs1* sont viables (~70% des spores contenant la double délétion survient) et les télomères dans la majorité des clones sont courts mais stables (Bonetti *et al.*,

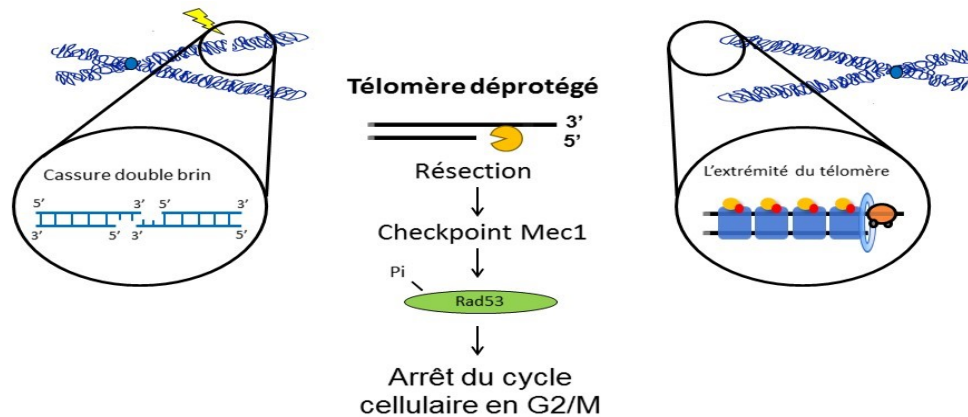
2009 ; Hardy *et al.*, 2014). L'analyse de cellules *sae2 sgs1* démontre que le raccourcissement des télomères est dû à l'accumulation des mutations dans les gènes codant pour Yku70 et Yku80 (Hardy *et al.*, 2014). Néanmoins, les télomères dans ces cellules sont maintenus par la télomérase et la RH, suggérant que les extensions simple brin 3' ont été régénérées en absence de Sae2 et Sgs1 fonctionnelles. La pression sélective pour inactiver le complexe Yku s'explique par sa capacité de supprimer les voies alternatives de résection dépendantes de Sgs1/Dna2 ou de Exo1 quand la fonction de MRX/Sae2 est compromise (Mimitou et Symington, 2010 ; Shim *et al.*, 2010). Ces nucléases sont importantes pour la résolution des structures aberrantes produites durant la réplication, dont la stabilisation par Yku en absence de MRX/Sae2 rend leur réparation plus lente et difficile (Krishna *et al.*, 2007 ; Foster *et al.*, 2011). Ceci pourrait aussi engendrer une pression sélective pour l'inactivation de Yku puisque les cellules *sae2 sgs1* se caractérisent également avec une croissance ralentie et l'activation du checkpoint suite à des problèmes au niveau de la réplication (Hardy *et al.*, 2014). Ainsi, au niveau de télomères natifs, de multiples activités nucléases contribueront à la formation des extrémités 3' simple brin, en plus d'intervenir dans la réparation adéquate des fourches arrêtées ou brisées lors de la réplication des télomères.

Évidemment, le traitement des extrémités des chromosomes par nucléases doit être finement régulé par les composantes de la coiffe télomérique. Par exemple, la résection aux télomères devrait être restreinte à l'étape initiale contrôlée par MRX/Sae2 qui génère de courtes extensions simple brin suffisant à la recréation de la structure terminale, mais, en même temps, la possibilité d'une dégradation extensive qui exposerait de longues régions simple brin sous-télomériques et activerait la DDR devrait être éliminée. Les rôles de protéines individuelles et leur mécanisme d'action n'étant pas encore concrétisés, les évidences indiquent que le complexe Yku inhibe l'initiation de la résection, tandis que les complexes CST et Rap1/Rif1/Rif2 régulent sa profondeur (Bonetti *et al.*, 2010 ; Vodenicharov *et al.*, 2010). Les deux derniers complexes probablement interviennent majoritairement au niveau de la régulation des nucléases lors du passage de la fourche de réplication pour contrer l'accumulation d'ADN simple brin et

l'activation de la DDR. Ceci dit, il est à noter que plusieurs études suggèrent aussi que les fonctions des membres des trois complexes dans la régulation des nucléases sont complémentaires. Plus de détails sur les rôles individuels de composants du capuchon télomérique dans la protection sont présentés dans la section 1.2.2.

## **1.2 CONSÉQUENCES DE LA DEPROTECTION DES TELOMERES : PARALLELES ET DIFFERENCES ENTRE TELOMERES ET CDB**

Tel qu'il a été mentionné antérieurement, la coiffe télomérique assure la protection et la réplication sans défaut de l'ADN télomérique. L'inactivation d'un de ses constituants conduirait à la dégradation ou la fusion des télomères, la stimulation de la DDR et l'arrêt du cycle cellulaire. L'activation de la DDR est présumée d'être due au fait que les télomères déprotégés sont perçus par la cellule comme une des extrémités d'une CDB (figure 1.3). De plus, une résection excessive qui déclenche la DDR peut également se produire suite à l'échec de la réplication de l'ADN aux télomères. Avant de discuter des conséquences des télomères déprotégés, nous allons décrire brièvement les mécanismes permettant aux cellules de faire face aux dommages à l'ADN, plus précisément, aux CDB.



**Figure 1.3 Représentation schématique des conséquences de la déprotection des télomères.** Cette cascade d'événements est activée également lorsqu'une CDB se produit au niveau d'ADN génomique. Dans cette figure, la déprotection des télomères par l'inactivation du complexe CST dans un mutant possédant l'allèle *cdc13-1* à une température restrictive a été utilisée afin d'illustrer la cascade d'événements qui conduit à l'activation de la réponse aux dommages à l'ADN chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

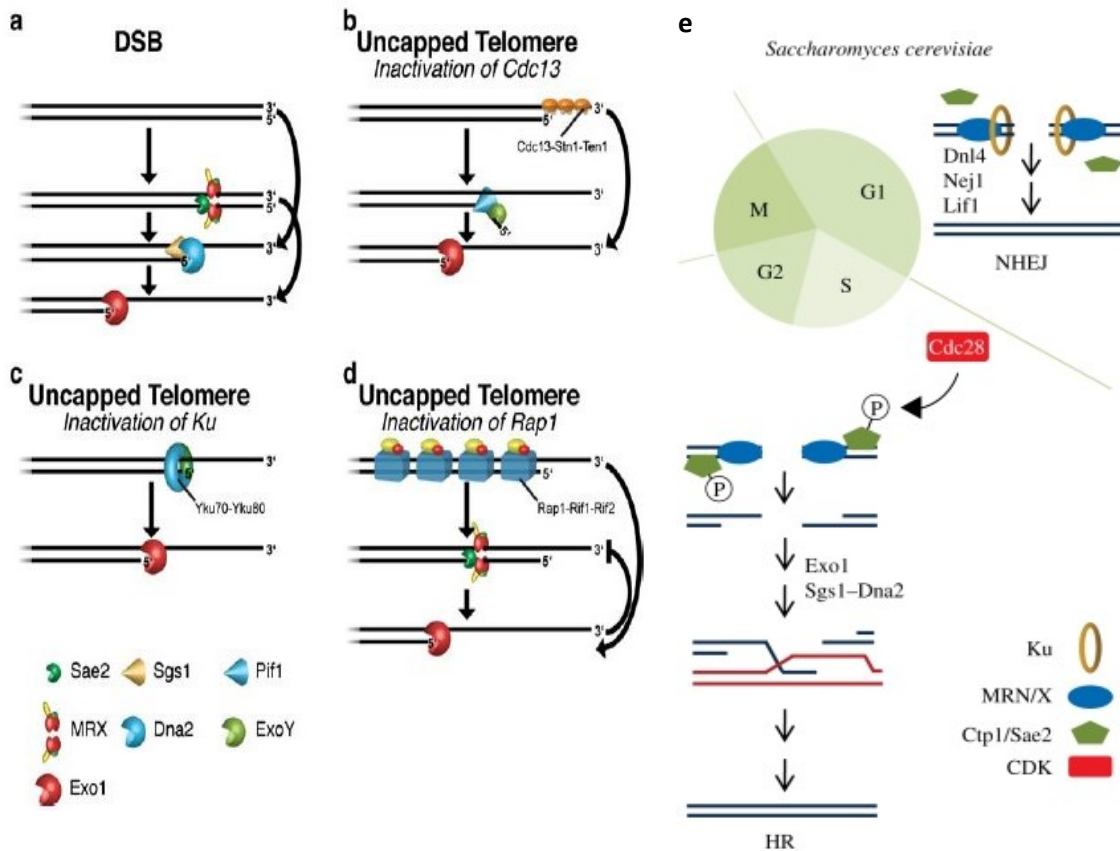
### 1.2.1 La cassure double brin

Les CDB sont les dommages à l'ADN parmi les plus toxiques pour la cellule et peuvent être produites par des radiations ionisantes, des agents chimiques, un stress oxydatif ou encore des problèmes survenant lors de la réplication (Lindahl, 1993). Il a été observé chez la levure qu'une seule CDB peut causer un arrêt robuste du cycle cellulaire (Sandell et Zakian, 1993). Les CDB ne sont pas forcément issues d'accidents ou d'états pathologiques puisque les cellules sont capables d'induire des CDB de manière contrôlée et s'en servir pour effectuer différentes tâches, telles que le changement du type sexué chez la levure ou la recombinaison des fragments V(D)J nécessaire lors de la formation des immunoglobulines chez les vertébrés, ou encore dans la méiose et la maturation des spermatozoïdes (Jackson et Bartek, 2009 ; Pâques et Haber, 1999 ; Soulas-Sprauel *et al.*, 2007). Pour les CDB indésirables découlant de différents types de stress, les cellules ont développé une série de mécanismes de réponse aux dommages et de réparation, nommé la DDR, pour permettre la réparation des cassures et la restauration de l'intégrité



génomique. Les CDB peuvent être traitées soit par la voie de la RH, qui génère de l'ADN simple brin (ADN sb) à l'aide de l'activité de nucléases, soit par la voie de la JENH, un processus qui dirige la ligation des bouts francs (Harrison et Haber, 2006). L'ADN sb généré comme un produit intermédiaire de la voie RH, est lié par la protéine RPA pour former un complexe nucléoprotéique qui contribue à l'activation de la DDR et à l'arrêt du cycle cellulaire (Usui *et al.*, 2001 ; Zou et Elledge, 2003). Les complexes Yku et MRX peuvent promouvoir la JENH, tandis que MRX permet aussi l'initiation de la RH. L'un ou l'autre de ces mécanismes sera promu selon l'emplacement dans le cycle cellulaire en fonction de l'activité de la protéine kinase cycline-dépendante, Cdc28 (Ira *et al.*, 2004 ; Aylon *et al.*, 2004). En phase G1, où Cdc28 a une faible activité, c'est la JENH qui sera préféré pour la réparation, alors qu'en phase S/G<sub>2</sub> où Cdc28 possède une forte activité, ce sera la RH qui dominera pour réparer les CDB (Moore et Haber, 1996 ; Ira *et al.*, 2004 ; Aylon *et al.*, 2004). En absence de séquences homologues, surtout en phase G1 du cycle cellulaire, les cellules utilisent la JENH qui permet la réparation des CDB, grâce au complexe Yku70/Yku80 (figure 1.4e). L'hétérodimère Ku lie des extrémités double brin, des épingles à cheveux et des cassures simple brin avec une grande affinité et de manière indépendante de la séquence nucléique (Mimori et Hardin, 1986 ; Blier *et al.*, 1993). La structure cristallographique de complexe Ku humain démontre que l'hétérodimère se lie sous forme d'anneau autour de l'extrémité d'ADN (Walker *et al.*, 2001). La réparation par la JENH a besoin d'extrémités "propres" contenant une extrémité 3'-hydroxyle et 5'-phosphate, comme les extrémités d'une coupure créées par une endonucléase, sinon la ligation ne peut s'effectuer (Symington et Gautier, 2011). Comme dans la plupart des espèces procaryotes et eucaryotes, chez la levure bourgeonnante, la JENH nécessite un complexe de reconnaissance de la cassure Yku, des activités nucléases fournies par MRX, la polymérase Pol4 afin de remplir les nucléotides manquants aux extrémités, des activités kinases servant à la signalisation et, enfin, une activité ligase fournie par le complexe ADN ligase IV (Lieber, 2010). Le complexe Yku70/Yku80 protège les extrémités de la dégradation et permet le recrutement du complexe protéique composé de l'ADN ligase IV Dnl4 et des protéines accessoires Lif1 et Nej1 qui stabilise la liaison du Yku à l'extrémité de la CDB (Zhang *et al.*, 2007). Les deux extrémités de la cassure sont maintenues ensemble via un domaine crochet de zinc de Rad50, une de sous-

unités du complexe MRX impliqué dans cette voie de réparation (Wiltzius *et al.*, 2005). C'est un moyen simple de réparer des CDB, surtout en G1 lorsque les gènes ne sont présents qu'en un seul exemplaire dans une cellule haploïde.



**Figure 1.4 Représentation schématique des ressemblances et des différences entre les facteurs qui réparent (a) les extrémités des cassures double brin (CDB) et l'extrémité des télomères déprotégés, (b) par l'inactivation de Cdc13, (c) du complexe Yku et (d) de Rap1 (Dewar et Lydall, 2012). (e) Représentation schématique des deux voies de réparation de CDB chez *Saccharomyces cerevisiae*, leur utilisation préférentielle selon la phase du cycle cellulaire et la dépendance de l'activité de Cdc28 (Langerak et Russell, 2011).**

Lorsque la nature des CDB ne permet pas leur réparation par la JENH ou lorsque des séquences homologues sont présentes dans la cellule, la voie de la RH est dominante. Pour trouver des

homologies dans le génome, ce système de réparation dégrade dans un premier temps le brin 5' de l'extrémité de la CDB. Cette dégradation se déroule de manière plus efficace en phase S/G2, en deux étapes: une résection initiale génère une courte extension de 50 à 100 nucléotides, suivie par une dégradation extensive allant jusqu'à plusieurs kb au loin de la cassure (Mimitou et Symington, 2011). L'étape d'initiation de la résection contrôlée des CDB est médiée par le complexe MRX et de la protéine Sae2. Mre11 possède une activité nucléase essentielle pour la réparation de l'ADN, tandis que Rad50 et Xrs2 permettent respectivement la dimérisation et l'interaction du complexe avec de protéines partenaires (Paull et Gellert, 1998 ; Stracker et Petrini, 2011). La protéine Sae2 est une protéine auxiliaire du complexe MRX qui stimule l'activité endonucléase de Mre11 (Cannavo et Cejka, 2014). La deuxième étape de résection implique une dégradation de l'extrémité 5' extensive sur plusieurs kb par des activités nucléases et hélicases spécifiques. Les deux étapes de résection collaborent lors de la production d'ADN simple brin au niveau de la CDB, un processus nécessaire pour l'induction de l'arrêt du cycle cellulaire et pour la réparation par la RH (Mimitou et Symington, 2011). Deux voies individuelles interviennent dans la dégradation profonde: une contrôlée par la hélicase Sgs1 et l'endonucléase Dna2 et l'autre régulée par l'exonucléase Exo1 (Zhu *et al.*, 2008 ; Mimitou et Symington, 2008). La coopération entre MRX et Sae2 stimule la résection extensive et, en même temps, MRX entre en compétition avec le complexe Ku pour la liaison de l'extrémité de la CDB (Shim *et al.*, 2010 ; Nicolette *et al.*, 2010). Le complexe Ku a peu d'affinité pour l'ADN simple brin; ainsi, la résection initiale favorise la RH et prévient l'exécution de la JENH non voulue (Daley *et al.*, 2005 ; Zhang *et al.*, 2010). Le complexe Yku inhibe la résection extensive par Exo1 ou Sgs1/Dna2, tandis que le complexe MRX permet d'outrepasser cette inhibition par la résection initiale stimulée par Sae2 (Cejka *et al.*, 2010 ; Mimitou et Symington, 2010 ; Shim *et al.*, 2010). Les deux étapes de la dégradation du brin 5' des CDB sont contrôlées en fonction du cycle cellulaire. Les activités nucléases sont dépendantes de l'activité de Cdc28, Sae2 et Dna2 étant deux cibles déjà identifiées, dont la phosphorylation, par cette kinase est importante pour leur activité (Huertas *et al.*, 2008 ; Chen *et al.*, 2011). Par la suite, les longues extensions simple brin produites par la résection sont liées par les protéines Rad51 et Rad52 de la

machinerie de la RH qui permet la recherche, l'invasion et l'alignement avec des séquences homologues pour initier la recombinaison (Barzel et Kupiec, 2008).

Avant même d'être engagées dans la recherche d'homologie, les longues extensions sb servent une autre fonction importante et c'est d'activer la DDR. L'ADN sb généré va pouvoir se lier au complexe RPA qui a une forte affinité pour le simple brin, promeut l'activité des nucléases et contribue à l'activation de la DDR (Zou et Elledge, 2003 ; Lisby *et al.*, 2004 ; Niu *et al.*, 2010 ; Cejka *et al.*, 2010 ; Cannavo *et al.*, 2013). L'ADN sb lié par RPA permet le recrutement indépendant de deux complexes, Mec1/Ddc2 et 9-1-1 (Rad9-Hus1-Rad1), collaborant ensemble dans l'activation de la DDR (Sanchez *et al.*, 1999 ; Kondo *et al.*, 2001 ; Melo *et al.*, 2001 ; Majka et Burgers, 2003 ; Lisby *et al.*, 2004). Mec1 est une protéine kinase de la famille PI3K responsable de la phosphorylation de plusieurs substrats nécessaire pour déclencher la DDR, comme l'histone H2A. L'histone H2A phosphorylée, ou  $\gamma$ H2A, recrute la protéine Rad9, qui sert de médiateur dans la DDR et permet l'activation des kinases effectrices, Rad53 et Chk1, par Mec1 (Downs *et al.*, 2004 ; Blankley et Lydall, 2004 ; Sweeney *et al.*, 2005 ; Hammet *et al.*, 2007 ; Usui *et al.*, 2009) qui vont arrêter le cycle en métaphase (Cohen-Fix et Koshland, 1997 ; Sanchez *et al.*, 1999 ; Hu *et al.*, 2001 ; Agarwal *et al.*, 2003 ; Lee *et al.*, 2003). RPA protège des extensions 3' simple brin d'une éventuelle dégradation jusqu'à son remplacement par la recombinase Rad51 qui autorise la recherche d'homologie dans le génome pour effectuer la RH (Shinohara *et al.*, 1992).

La cascade de signalisation menant à l'activation de la DDR décrite ci-haut est strictement dépendante de la résection de la CDB et la présence d'ADN sb recouvert par la protéine RPA. Lorsque l'initiation de la résection est compromise, par exemple dans certains mutants du complexe MRX ou dans les cellules *sae2 $\Delta$* , une activation de la DDR a été toujours observée. Cette activation est dépendante d'une autre kinase de la famille PI3K chez la levure, appelée Tel1, recrutée aux CDB par l'interaction avec la protéine Xrs2 du complexe MRX (Usui *et al.*,

2001 ; Nakada *et al.*, 2003). Tel1 permet par la suite la signalisation des CDB et le recrutement des facteurs de la DDR, comme la protéine adaptatrice Rad9, de manière similaire de celle décrite pour la kinase Mec1. Les kinases Mec1 et Tel1 permettent le maintien de la stabilité du génome par l'initiation d'un arrêt du cycle cellulaire (*checkpoint*) et l'activation des systèmes de réparation dans la cellule (Morrow *et al.*, 1995 ; Sanchez *et al.*, 1996 ; figure 1.4e). De plus, les deux kinases jouent un rôle dans le maintien des télomères (Lustig et Petes, 1986 ; Greenwell *et al.*, 1995), puisque les mutants *tell1Δ* comportent des télomères extrêmement courts. Les souches *mec1Δ tell1Δ* subissent une sénescence cellulaire avec une cinétique ressemblant à celle des cellules manquant la télomérase, ainsi qu'un taux élevé de fusions télomériques, réarrangement chromosomique et de perte de chromosome par rapport à un type sauvage (Lustig et Petes, 1986 ; Ritchie *et al.*, 1999 ; Craven *et al.*, 2002 ; Chan et Blackburn, 2003 ; Mieczkowski *et al.*, 2003).

### 1.2.2 Les télomères déprotégés de *Saccharomyces cerevisiae*

La fonction principale de la coiffe télomérique est de protéger les extrémités des chromosomes contre les mécanismes de réparation de l'ADN (figure 1.4e). La perte de fonction de la coiffe télomérique a été démontrée expérimentalement par la présence de chromosomes fusionnés, par la dégradation accrue et l'accumulation d'ADN simple brin et par l'arrêt du cycle cellulaire. Néanmoins, il a été observé que des protéines impliquées dans la réparation des CDB sont également impliquées dans la protection des télomères. Un exemple flagrant est le complexe Yku70-Yku80, recruté précocement au niveau des CDB et essentiel pour la JENH, sa délétion entraîne un raccourcissement des télomères et une dégradation plus importante du brin 5' tout au long du cycle cellulaire (Porter *et al.*, 1996 ; Boulton et Jackson, 1996 ; Gravel *et al.*, 1998 ; Polotnianka *et al.*, 1998). Le complexe MRX, recruté aussi au niveau des CDB pour faciliter la RH, est essentiel au maintien des télomères normaux (Nugent *et al.*, 1998 ; Ritchie et Petes, 2000). Les délétions des kinases Mec1 et Tel1, impliquées dans la

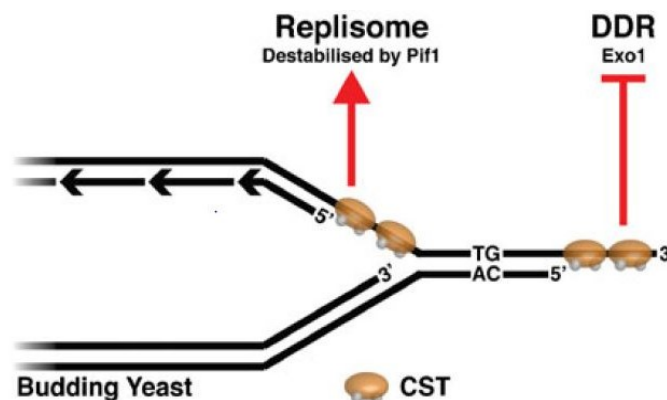
reconnaissance des CDB et dans l'activation de la DDR, entraînent un raccourcissement des télomères et une augmentation de la fréquence de fusions entre télomères (Chan et Blackburn, 2003 ; Mieczkowski *et al.*, 2003 ; Craven *et al.*, 2002). Ces données indiquent que plusieurs facteurs participant à la DDR et la réparation des CDB sont aussi nécessaires pour maintenir les extrémités des chromosomes eucaryotes, suggérant que leurs activités doivent être strictement contrôlées au niveau des télomères.

La déprotection expérimentale des télomères permet de déterminer les effets des activités agissant aux télomères, ainsi que les fonctions de protection de chaque composant de la coiffe télomérique. Comme vu précédemment, *cdc13-1* est un allèle thermosensible menant à une perte de fonction de Cdc13 à température non-permissive, menant à une dégradation très importante du brin 5' C-riche et à un arrêt du cycle cellulaire dépendant de Rad9 (Garvik *et al.*, 1995 ; Lydall et Weinert 1995). L'effet de cet allèle à température non-permissive entraîne le recrutement aux télomères de nombreux senseurs de dommage à l'ADN (Melo *et al.*, 2001 ; Rouse et Jackson, 2002). Comme au niveau des CDB, les protéines impliquées dans l'activation de la DDR semblent réguler la dégradation du brin C-riche télomérique. Ainsi, par des méthodes de PCR quantitative, les membres du complexe 9-1-1 et la protéine Rad24, se sont révélées stimuler la production de simple brin aux télomères dans le contexte *cdc13-1* alors que d'autres comme Rad9, Mec1 ou Rad53 ont un effet inverse et inhibent les activités nucléases (Lydall et Weinert, 1995 ; Lydall et Weinert, 1997; Booth *et al.*, 2001 ; Zubko *et al.*, 2004 ; Jia *et al.*, 2004). Le complexe 9-1-1 probablement est responsable du recrutement et de la rétention d'une nucléase aux télomères déprotégés, malgré que jusqu'à présente une telle activité nucléase associée au 9-1-1 n'a pas été identifiée. La chromatine télomérique a son rôle à jouer aussi puisque la méthylation de l'histone H3 sur sa lysine 79 par l'histone méthyletransférase Dot1 permet le recrutement de Rad9 et l'atténuation des activités nucléase aux télomères (Lazzaro *et al.*, 2008).

Les études à l'aide d'allèle *cdc13-1* ont permis de déterminer que les activités nucléases intervenant à la suite de l'inactivation du complexe CST sont similaires, mais pas identiques, à celles intervenant dans la résection des CDB. Exo1 a été alors identifiée comme la nucléase majeure impliquée dans la génération de l'extension 3' simple brin aux télomères, mais ne semble pas être l'unique voie de dégradation survenant dans le contexte d'allèle *cdc13-1* (Maringele et Lydall, 2002 ; Zubko *et al.*, 2004). Exo1 semble avoir un rôle beaucoup plus important dans la dégradation des télomères déprotégés suite à l'inactivation du complexe CST que dans la résection de CDB. Cette différence est probablement due au fait que les structures laissées après l'inactivation de Cdc13 représentent de substrats propices d'Exo1, tandis qu'au niveau de CDB les extrémités doivent être transformées par MRX/Sae2 avant de devenir le bon substrat pour Exo1. Plus surprenant encore, en désaccord avec sa fonction de promoteur de résection aux CDB, le complexe MRX réduit le taux de résection de télomères déprotégés et améliore la viabilité des cellules *cdc13-1* à température non-permissive (Foster *et al.*, 2006). Ce phénomène pourrait être expliqué par l'intervention d'un des autres protéines télomériques qui empêcherait l'interaction de MRX avec, par exemple, sa protéine auxiliaire Sae2 ou bien par le recrutement par MRX de la télomérase proposée de contribuer à la suppression de la résection aux télomères (Vega *et al.*, 2007).

Une autre différence majeure entre les CDB et les télomères déprotégés dans la souche *cdc13-1* découle probablement de la similarité structurale entre les complexes CST et RPA et le rôle du CST dans la réplication des télomères (Gao *et al.*, 2007 ; Sun *et al.*, 2009 ; Paschini *et al.*, 2010). La fonction envisageable du CST au cours de la réplication de l'ADN terminale peut se rapporter à la restriction de l'action des nucléases responsables de la maturation des fragments Okazaki ou de la résolution de structures obstruant la progression de la fourche de réplication. Ce genre de problèmes peut arriver souvent lorsque la progression de la fourche de réplication est ralentie aux télomères ou bloquée par la présence de structures secondaires (Paeschke *et al.*, 2010). Récemment, la hélicase Pif1 connue pour son implication dans le traitement des fragments Okazaki, la résolution des structures secondaires et stabilisation de la fourche de

réplication (Budd *et al.*, 2006 ; Pike *et al.*, 2009 ; Ribeyre *et al.*, 2009 ; Lopes *et al.*, 2011 ; Paeschke *et al.*, 2011 ; Paeschke *et al.*, 2013), était dotée d'un rôle critique dans la résection des télomères déprotégés dans les mutants *cdc13-1* (Dewar et Lydall, 2010 ; figure 1.5). De manière étonnante, la délétion simultanée de *EXO1* et *PIF1* élimine complètement la résection et permet la croissance en absence de Cdc13 (Dewar et Lydall, 2010). L'effet de délétion de *PIF1* est beaucoup plus prononcé que celle de *SGS1* parce qu'une résection extensive (de plus de 500 nt) a été détectée dans les cellules *cdc13-1 exo1 sgs1* (Ngo et Lydall, 2010). Ces données indiquent que, contrairement à ce qui était observé pour les CDB, la hélicase Pif1 contribue à la résection des télomères décoiffés d'une manière plus importante que Sgs1, et que la fonction essentielle de Cdc13 est de contrer la résection médiée par Pif1 et Exo1.



**Figure 1.5** Modèle pour le rôle du complexe CST de la levure bourgeonnante *S. cerevisiae* dans la réplication des télomères et autres régions du génome afin de réprimer la réponse aux dommages à l'ADN (DDR). (Dewar et Lydall, 2012)

La fonction de protection de CST lors de la réplication des télomères semble être soutenue par les membres du complexe Rap1-Rif1-Rif2 de la coiffe. Rif1 et Rif2 inhibent l'activation de la DDR aux télomères soit en limitant l'ADN sb ou en opposant le recrutement de RPA au niveau du simple brin télomérique généré dans les souches *cdc13-1* (Xue *et al.*, 2011 ; Ribeyre et Shore, 2012). La délétion de *RIF1* résulte d'une perte de viabilité plus importante de cellules *cdc13-1*



après la déprotection des télomères (Anbalagan *et al.*, 2011). Cette même délétion détériore la viabilité également des mutants MRX et *sae2Δ* (Martina *et al.*, 2014), qui éprouvent de problèmes de réplication aux télomères (Hardy *et al.*, 2014). De plus, la délétion de *RIF1* rend non viable la souche *dna2 pif1-m2* (Martina *et al.*, 2014), suggérant que le rôle de Rif1 est de supporter la vie dans des situations où la réplication des télomères est problématique ou défectueuse, un rôle normalement rattaché au CST. La proposition que le CST accomplit ses tâches exclusivement durant la réplication est appuyée par des observations, réalisées dans des cellules synchronisées à l'aide d'allèles degon, que le complexe CST est uniquement nécessaire pour protéger les télomères contre la résection à la fin de la phase S et G2/M, le temps de leur réplication, mais pas dans les phases G1 et S précoce, et dans les cellules quiescentes (Vodenicharov et Wellinger, 2006 ; Vodenicharov et Wellinger, 2007 ; Vodenicharov *et al.*, 2010).

Les conséquences de la déprotection induite par abolition des protéines du complexe Rap1-Rif1-Rif2 sont relativement peu explorées. Les études démontrent que Rap1, en association avec ses partenaires Rif1 et Rif2, permet, d'un côté, de prévenir les fusions télomère-télomère, et, d'autre côté, de limiter la résection des télomères (Pardo et Marcand, 2005 ; Marcand *et al.*, 2008 ; Bonetti *et al.*, 2010 ; Vodenicharov *et al.*, 2010). L'utilisation d'un allèle degon de *RAP1* pour déprotéger les télomères provoque une accumulation de simple brin aux télomères dans les cellules en phase G<sub>0</sub> ou en division (Vodenicharov *et al.*, 2010). Dans le cas des cellules en division, cette résection accrue dépend d'Exo1, mais persiste en absence d'Exo1 dans les cellules quiescentes. De plus, la présence d'ADN sb aux télomères dépourvus de Rap1 ne provoque pas l'activation de la DDR, ce qui est expliqué par le fait que les extensions 3' sb générés sont assez courtes (Vodenicharov *et al.*, 2010). Par contre, une autre étude démontre que les souches portant la délétion de *RIF2* ou le domaine C-terminal de Rap1 (c'est le domaine liant Rif2) présentent aussi une accumulation de simple brin télomérique en phase G<sub>1</sub> et G<sub>2</sub> du cycle cellulaire (Bonetti *et al.*, 2010b). Ces études indiquent que suite à la délétion de *RIF2*, la formation d'extensions 3' G-riches est fortement dépendante du complexe MRX (Bonetti *et al.*,

2010b ; figure 1.4d). Ensemble, ces deux études démontrent que la protéine Rap1 elle-même supprime directement la résection par Exo1, en plus d'inhiber l'initiation de la résection par MRX grâce au recrutement de Rif2. Notamment, les cellules quiescentes se comportent différemment des cellules en division en ce qui concerne des effets de l'inactivation de Rap1 et leurs exigences de nucléases conduisant à la résection (Vodenicharov *et al.*, 2010 ; figure 1.4d).

Finalement, la délétion d'une des sous-unités de l'hétérodimère Yku, *yku70Δ* ou *yku80Δ*, entraîne aussi une déprotection des télomères qui se caractérise avec une diminution générale de la taille des télomères et une extension G-riche simple brin plus long que sur les télomères normaux (Gravel *et al.*, 1998 ; Polotnianka *et al.*, 1998 ; figure 1.4c). La présence du complexe Yku est importante pour protéger les télomères contre la résection extensive provoquée par la nucléase Exo1 (Maringele et Lydall, 2002 ; figure 1.4c). Contrairement à la situation après l'inactivation du complexe CST, le complexe 9-1-1 ne semble pas participer à la résection des télomères déprotégés de mutants *ykuΔ*, ni à l'activation de la DDR dans ces cellules. Le rôle protecteur du complexe Yku a été révélé en analysant la résection des télomères à la phase G<sub>1</sub> (Vodenicharov et Wellinger, 2007 ; Vodenicharov *et al.*, 2010 ; Bonetti *et al.*, 2010), puisque les télomères des cellules *ykuΔ* étaient principalement dégradés à ce moment, bien qu'en présence du complexe CST. Cette activité de protection du complexe Yku semble gagner d'importance à la phase G<sub>1</sub> ou dans les cellules quiescentes en phase G<sub>0</sub> et fonctionne en parallèle avec la protéine Rap1 (Bonetti *et al.*, 2010a ; Vodenicharov *et al.*, 2010). Dans les cellules quiescentes, le complexe Yku inhibe l'activité de MRX, en plus de celle d'Exo1 (Vodenicharov *et al.*, 2010). Le degré de la résection dans les cellules *ykuΔ* est beaucoup plus modeste que la résection qui se produit au cours de la phase S tardive dans les cellules *cdc13-1* exposées à des températures élevées. Le niveau limité de résection dans des mutants *ykuΔ* n'est pas suffisant pour activer l'arrêt du cycle cellulaire (Bonetti *et al.*, 2010 ; Vodenicharov *et al.*, 2010).

La reconnaissance des télomères comme un dommage à l'ADN semble jouer un rôle dans diverses pathologies, tels le vieillissement et le cancer, et dans plusieurs maladies génétiques, tels la dyskératose congénitale, l'obésité et le diabète (Bodnar *et al.*, 1998 ; Mitchell *et al.*, 1999 ; Vulliamy *et al.*, 2001 ; Fuster et Andres, 2006 ; Minamino *et al.*, 2009). Ainsi, les télomères et les CDB ne doivent pas être traités de la même manière. Pris ensemble les résultats obtenus, en utilisant la levure bourgeonnante comme modèle, indiquent que chaque composant de la coiffe télomérique inhibe des acteurs différents de la résection du brin C-riche, et que certains composants ne seraient pas indispensables à tout moment du cycle cellulaire.

## **1.3 LE CYCLE CELLULAIRE**

### **1.3.1 Le cycle cellulaire chez *Saccharomyces cerevisiae***

Le cycle cellulaire représente une série d'événements ordonnés qui permet aux cellules de se diviser. Pendant ce processus hautement régulé, une cellule dite « mère » va dupliquer son contenu génétique et va se diviser en deux cellules « filles » génétiquement identiques, qui à leur tour répéteront ce cycle de division cellulaire. Selon les particularités morphologiques, on discerne différents types de division, dont la division par bourgeonnement qui est caractéristique de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Le cycle cellulaire de la levure bourgeonnante, tout comme celui des autres cellules eucaryotes, est constitué de quatre phases : une première phase de croissance où la cellule accroît sa masse, augmente le nombre des organites et s'assure que les conditions internes et externes sont adéquates pour la synthèse de l'ADN ( $G_1$ ), une phase de duplication du génome (S), une deuxième phase de croissance où la cellule s'assure des conditions sont appropriées pour entrer en mitose ( $G_2$ ) et une phase de ségrégation des chromosomes par division mitotique (M). Finalement, une période très courte, appelée cytokinèse, assure la division du cytoplasme et la séparation des deux cellules filles. La

succession ordonnée de ces étapes et des différents événements qui arrivent dans chaque phase du cycle cellulaire est contrôlée par des points de contrôle, comme les entrées et les sorties des phases S et M qui sont très fortement régulées dans le but de minimiser la transition précoce à la prochaine phase du cycle et d'empêcher qu'un événement se passe une deuxième fois durant le cycle cellulaire en cours. D'autre part, la progression du cycle cellulaire peut être bloquée également en activant la DDR après des dommages à l'ADN, telles les CDB, comme discuté précédemment.

### 1.3.2 Les kinases du cycle cellulaire

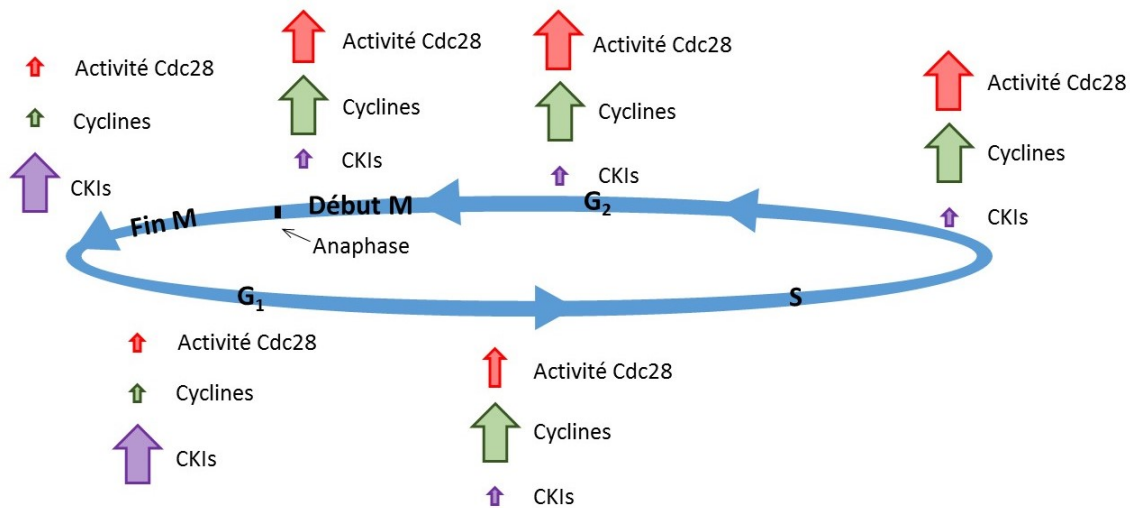
Il est maintenant connu que la famille des kinases cycline-dépendante (CDK pour *Cyclin-dependent kinase*) est impliquée dans la progression du cycle cellulaire chez les cellules eucaryotes. La Cdk principale de la levure bourgeonnante, Cdc28 (ou Cdk1), a été initialement découverte lors des criblages génétiques entrepris dans le but d'identifier de gènes contrôlant le cycle cellulaire (Hartwell *et al.*, 1973 ; Hartwell, 1974). Les sous-unités catalytiques des CDKs eucaryotes sont généralement reconnues par les séquences hautement conservées entre les différents membres de la famille (Hanks et Hunter, 1995 ; Lörinez *et al.*, 1984 ; Nasmyth et Reed, 1980), en particulier le domaine situé près de l'extrémité N-terminale nommé le motif PSTAIRE. Les CDKs sont des protéines kinases qui ajoutent un ou des groupements de phosphate sur des résidus sérine ou thréonine des protéines cibles (Nigg, 1993). La phosphorylation de ces substrats peut soit activer ou soit inhiber la protéine cible. Tel qu'indiqué par leur nom, les kinases cycline-dépendante nécessitent l'association d'une sous-unité de cycline pour avoir leur activité (voir les sections sur les cyclines de la phase G1 [Cln1-3] et les cyclines de type B [Clb1-6]). L'expression et la dégradation contrôlées de ces cyclines permettent aux cellules de réguler positivement ou négativement l'activité des CDKs. L'activité des CDKs peut aussi être régulée négativement par des protéines inhibitrices des CDKs (CKI pour *Cyclin kinase inhibitors*) (Morgan, 1995). Un autre type de régulation des CDKs est par la

phosphorylation de résidus particuliers par d'autres CDKs qui peut activer ou supprimer l'activité kinase. Par exemple, l'activité de la kinase Cdc28 peut être inhibée par la phosphorylation du groupement tyrosine à la position 19 (Y19) (Booher *et al.*, 1993). Par contre, la phosphorylation du résidu thréonine à la position 169 (T169) sert à activer la kinase Cdc28 (Kaldis *et al.*, 1996 ; Espinoza *et al.*, 1996 ; Thuret *et al.*, 1996). La phosphorylation de ce résidu est connue pour induire l'ouverture de la région de liaison aux substrats et de faciliter le contact entre la Cdc28 et la cycline (Russo *et al.*, 1996 ; Ross *et al.*, 2000).

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, Cdc28 est la kinase principale qui permet la coordination des événements majeurs essentiels à la progression du cycle cellulaire. Cette kinase est la plus étudiée et possède plusieurs fonctions au sein de la cellule. Ses fonctions sont regroupées et présentées en deux groupes, la fonction classique et les fonctions non classiques, qui seront présentés dans les sections suivantes. Outre que la Cdc28, *S. cerevisiae* a cinq autres CDKs : Pho85 (similaire au Cdk5 des cellules de mammifères), Kin28 (similaire au Cdk7 des cellules de mammifères), Ssn3 (similaire au Cdk8 des cellules de mammifères), Ctk1 et Bur1 (correspondent au Cdk9 des cellules de mammifères) (Enserink et Kolodner, 2010). Pho85, une kinase non essentielle, s'associe avec deux cyclines de la famille Pcl (Pcl1 et 2) pour accomplir son rôle dans le passage de la phase G<sub>1</sub> (Ogas *et al.*, 1991 ; Tyers *et al.*, 1993). Bien que l'activité de Cdc28 semble être suffisante pour permettre la bonne progression du cycle, nombreuses fonctions de Cdc28, notamment dans les phases précoces du cycle cellulaire, sont soutenues par Pho85 (Huang *et al.*, 2007). Les autres CDKs, Kin28, Ssn3 et Ctk1, jouent des rôles variés dans la transcription exclusivement (Meinhart *et al.*, 2005).

### 1.3.2.1 La fonction classique de Cdc28

La fonction principale de Cdc28 est de permettre la progression du cycle cellulaire, ce qui résulte, en grande partie, de la régulation de son activité au cours du cycle cellulaire. La représentation schématique de la figure 1.6 illustre les fluctuations du niveau d'activité de Cdc28 en fonction de la régulation par les cyclines et les inhibiteurs de kinase cyclin-dépendante (CKIs). Durant la phase G<sub>1</sub>, la Cdc28 est inactive due à une faible concentration de cyclines et d'une forte présence de CKIs (Schwob *et al.*, 1994 ; Alberghina *et al.*, 2004). En fin de la phase G<sub>1</sub>, lorsque les CKIs sont dégradés et la concentration des cyclines augmente, l'activité de Cdc28 augmente (Mendenhall et Hodge, 1998). Par la suite, l'activité de Cdc28 reste élevée jusqu'en anaphase. À l'anaphase l'activité de Cdc28 sera à nouveau réduite puisque les cyclines seront dégradées et les CKIs seront exprimés à nouveau (Schwob *et al.*, 1994 ; Amon *et al.*, 1994). À cette étape du cycle cellulaire, il a été démontré que les cibles de Cdc28 seront déphosphorylées par une phosphatase, la Cdc14. Cela contribue à la réinitialisation du cycle cellulaire, à une baisse dans l'activité de Cdc28 et à une hypophosphorylation des cibles de Cdc28. La fluctuation de l'activité de Cdc28 permet d'assurer l'irréversibilité des différentes phases du cycle cellulaire, de restreindre la réplication de l'ADN et de prévenir l'instabilité génomique (de Bruin *et al.*, 2006 ; Skotheim *et al.*, 2008 ; Charvin *et al.*, 2009 ; Charvin *et al.*, 2010). Ainsi, les fonctions classiques de Cdc28 se rapportent directement à la régulation de la progression du cycle cellulaire au cours duquel l'activité de Cdc28 contrôle un grand nombre d'évènements critiques et très variés, comme les programmes transcriptionnels, la réplication et ségrégation des chromosomes, la morphogenèse et la polarité cellulaire. Dans le paragraphe qui suit, je discute brièvement des fonctions de Cdc28 dans la régulation d'expression génique à titre d'exemple d'une fonction classique. Les fonctions non classiques de Cdc28, étant plus pertinentes par rapport des objectifs de mon projet de recherche et de ce mémoire, seront abordées en plus de détails.



**Figure 1.6 Représentation schématique des différents niveaux d'activité de Cdc28, des cyclines et des inhibiteurs de Cdc28, les CKIs, dans les différentes phases du cycle cellulaire de la levure *Saccharomyces cerevisiae*.**

Lors de la phase G<sub>1</sub>, Cdc28 en complexe avec la cycline Cln3, régule le départ du cycle cellulaire et la transition G<sub>1</sub>-S par activation de la transcription des cyclines de la phase G<sub>1</sub> et de plusieurs autres gènes cibles (Tyers *et al.*, 1993 ; Stuard et Wittenbrg, 1995). L'activation de la transcription des gènes de la phase G<sub>1</sub> est médiée par les complexes de facteurs de transcription SBF (pour *Swi4/6 Cell Cycle Box Binding Factor*) et MBF (pour *Mlu1 Cell Cycle Factor Binding Factor*). Cdc28 contrôle SBF/MBF par l'intermédiaire de leur sous-unité partagée, Swi6 (Wijnen *et al.*, 2002). Au début de la phase G<sub>1</sub>, le complexe SBF est lié aux promoteurs des gènes cibles, mais est inactivé par la protéine inhibitrice Whi5 (de Bruin *et al.*, 2004). Ce n'est que suite à la phosphorylation de Whi5 par les kinases Cdc28-Cln3 et Pho85 que SBF sera active (Koch *et al.*, 1996 ; Costanzo *et al.*, 2004). L'activité de Cdk1-Cln3 facilite ensuite le recrutement de l'ARN polymérase II aux promoteurs de ses gènes cibles (Cosma *et al.*, 2001). Bien que les groupes de gènes ciblés par les complexes SBF et MBF se chevauchent, MBF semble d'induire préférentiellement la transcription de gènes impliqués dans le contrôle et l'exécution de la réplication et la réparation de l'ADN, tel *POL2*, *CLB5* et *CLB6*, or que SBF régule la transcription de gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire, la morphogenèse de la cellule et la duplication des corps polaires du fuseau (Wittenberg et Reed,

2005). Notamment, l'élimination d'effet inhibiteur de Whi5 médiée par Cdc28-Cln3 induit l'expression de gènes de la phase G<sub>1</sub>, *CLN1* et *CLN2*. Ces deux cyclines s'assoient avec Cdc28 pour promouvoir la transcription par SBF/MBF qui est nécessaire pour la transition vers la phase S (Skotheim *et al.*, 2008). Plusieurs mécanismes sous le contrôle de Cdc28 ont été proposés d'intervenir dans l'arrêt du programme transcriptionnel de la phase G<sub>1</sub> et de permettre à la cellule d'entrer à la phase S. Ces mécanismes s'étendent de l'inactivation directe de Swi6 et Swi4 (Koch *et al.*, 1996 ; Siegmund et Nasmyth, 1996 ; Sidorova *et al.*, 1995) ou l'exclusion des cofacteurs de SBF/MBF du noyau (Ashe *et al.*, 2008; Kosugi *et al.*, 2009) à l'activation de suppresseurs de transcription, tel que Nrm1, qui lie et inhibe le complexe MBF (de Bruin *et al.*, 2006). Une fois achevé, le programme de la phase G<sub>1</sub> est suivi par l'expression de groupe de gènes de la phase S incluant les gènes d'histones, les gènes de différents facteurs impliqués dans l'organisation des chromosomes et la dynamique du fuseau mitotique et les gènes codant pour des facteurs de transcription, tels que les protéines de la famille «*Forkhead*». Outre que la régulation des facteurs de transcription, Cdc28 module la transcription en interagissant avec le protéasome qui facilite l'élongation par l'ARN polymérase II (Ferdous *et al.*, 2001 ; Gonzalez *et al.*, 2002) ou par la régulation de facteurs modifiant la structure de la chromatine (Veis *et al.*, 2007 ; Holt *et al.*, 2009 ; Fiedler *et al.*, 2009). En conclusion, Cdc28 dispose de nombreux outils pour réguler différents aspects de l'expression génique ainsi contribuant à la progression contrôlée du cycle cellulaire.

### **1.3.2.2 Les fonctions non classiques de Cdc28**

Outre que son rôle dans la progression du cycle cellulaire, Cdc28 est également connue pour être impliquée dans le métabolisme de l'ADN. Cet effet de Cdc28 a été initialement reconnu puisque les défauts dans sa régulation ont été trouvés à entraîner l'instabilité du génome qui est un prélude vers le vieillissement ou le développement de cancers. D'abord, certains mutants réduisant l'activité de Cdc28 manifestent un taux élevé de perte de chromosomes (Nugroho et



Mendelhall, 1994 ; Lengronne et Schwob, 2002 ; Kitazono et Kron, 2002). À part de son rôle dans la maintenance de stabilité des chromosomes et la ploïdie, Cdc28 participe dans plusieurs mécanismes qui assurent la stabilité du génome. Dans les dernières années, plusieurs études ont démontré que Cdc28 a des fonctions au niveau de la réparation des CDB, dans l'activation de la DDR (Li et Cai, 1997 ; Meyn et Holloway, 2000 ; Enserink *et al.*, 2009) et est également impliquée dans la formation d'extension 3' simple brin aux télomères natifs et déprotégés (Vodnicharov et Weillinger, 2007).

#### **1.3.2.2.1 Cdc28 et la régulation du choix de voie de réparation durant le cycle cellulaire**

Comme vu précédemment, la compétition entre les complexes Yku et MRX est un élément important dans le choix de la voie de réparation suite à une CDB. Pour favoriser la JENH, le complexe Yku inhibe les activités nucléases précoces (Wu *et al.*, 2008). Dès que la résection est initiée par MRX, l'inhibition de la RH par Yku est levée et la JENH est défavorisée (Ira *et al.*, 2004 ; Zhang *et al.*, 2010). Les activités de résection impliquées dans la RH dépendent de l'activité de Cdc28 et elles sont promues en phase S et G<sub>2</sub> quand l'activité de Cdc28 est la plus importante (Aylon *et al.*, 2004 ; Ira *et al.*, 2004). Tandis que la JENH qui est surtout observée en phase G<sub>1</sub> du cycle cellulaire est favorisée lorsque l'activité de Cdc28 est faible (Frank-Vaillant et Marcand, 2002 ; Karathanasis et Wilson, 2002 ; Ferreira et Cooper, 2004 ; Barlow *et al.*, 2008). En plus de promouvoir la résection des CDB en S/G<sub>2</sub>/M, Cdc28 stimule le recrutement des facteurs de la RH, tel que la protéine Rad52 (Barlow et Rothstein, 2009). La résection aux CDB se produit en deux étapes : la résection initiale, menée par MRX/Sae2, est très limitée et est suivie par la résection extensive par l'action de Sgs/Dna2 ou d'Exo1 (Zhu *et al.*, 2008 ; Mimitou et Symington, 2008 ; figure 1.4a). Sae2 et Dna2 sont deux cibles déjà identifiées de Cdc28 dont la phosphorylation est importante pour leur activité (Huertas *et al.*, 2008 ; Chen *et al.*, 2011). De plus, Cdc28 phosphoryle les sous-unités Mre11 et Xrs2 du complexe MRX en mitose pour directement supprimer la JENH (Simoneau *et al.*, 2014).

#### **1.3.2.2.2 Cdc28 et l'activation de checkpoint**

Outre que son rôle dans l'induction de la RH suite à une CDB, il a été démontré que Cdc28 est requise pour activer l'arrêt du cycle cellulaire (Ira *et al.*, 2004). Cependant, il existe des résultats contradictoires concernant l'implication de Cdc28 dans l'activation de la DDR. Une explication qui pourrait expliquer ses résultats opposés peut être les différents types de dommages à l'ADN analysés dans les différentes études en question qui peuvent conduire à des réponses aussi différentes. Une autre possibilité est que la cellule, dépendamment du stade du cycle cellulaire, pourrait répondre différemment à une CDB. En effet, il y aura une réponse modérée du checkpoint si la CDB se produit au cours de la phase G<sub>2</sub>/M, alors que si la CDB a lieu pendant la phase S l'activation du checkpoint sera plus prononcée due à l'arrêt de la fourche de réplication (Zierhut et Diffley, 2008). Il est possible qu'une telle réponse forte ne nécessite pas l'activité de Cdc28. Une dernière explication pourrait être qu'étant donné que l'activité de Cdc28 n'est pas suffisante pour activer la DDR, ainsi un mécanisme secondaire pourrait être impliqué (Barlow *et al.*, 2008). Finalement, il est suggéré que Cdc28 régule l'activation de checkpoint par la phosphorylation de la protéine Rad53 (Schleker *et al.*, 2010), une protéine qui stimule l'arrêt du cycle cellulaire en présence de dommages à l'ADN. Cette phosphorylation permet de prévenir contre l'adaptation, un processus dans lequel une cellule reprend la division cellulaire, même en présence de dommages à l'ADN.

#### **1.3.2.2.3 Cdc28 et la résection au niveau des télomères**

Au cours de la réplication des télomères, la taille de l'extension 3' G-riche augmente et cette augmentation était proposée d'être un résultat de la résection du brin C-riche par l'activité des nucléases (Wellinger *et al.*, 1996). Comme ce qui est observé au niveau de la résection du brin 5' C-riche des CDB (Ira *et al.*, 2004 ; Aylon *et al.*, 2004), la résection au niveau des télomères

déprotégés nécessite l'activité de Cdc28 (Vodenicharov et Wellinger, 2006). Notamment, l'augmentation de la taille de l'extension 3' simple brin à la fin de phase S est complètement perdue dans des situations où l'activité de Cdc28 est supprimée, suggérant que cette activité est aussi importante pour la reconstruction de la structure terminale des télomères natifs après la réplication des télomères (Vodenicharov et Wellinger, 2006 ; Frank *et al.*, 2006). La nucléase Sae2 impliquée dans l'étape d'initiation de la résection au niveau des CDB est une cible connue de Cdc28 (Zhu *et al.*, 2008), qui participe également à la formation des extensions 3' simple brin de télomères néoformés (Bonetti *et al.*, 2009). L'utilisation de l'allèle *sae-S267A*, muté au niveau de son site de phosphorylation par Cdk1, confirme que la phosphorylation de Sae2 est nécessaire pour une résection adéquate du brin C-riche des télomères (Bonetti *et al.*, 2009). Bien que l'inhibition de Cdc28 entraîne la perte totale de la résection au niveau des télomères déprotégés et natifs (Vodenicharov et Wellinger, 2006), l'ajout des séquences télomériques sur un télomère néoformé n'est pas entièrement supprimé par l'abolition du site de phosphorylation sur Sae2, suggérant que d'autres activités régulées par Cdc28 participent à la résection des télomères.

### **1.3.3 Les cyclines du cycle cellulaire chez *Saccharomyces cerevisiae***

Les premiers découverts sur les cyclines ont été faits lors des études biochimiques dans les échinides (Evans *et al.*, 1983). Ce que Evans *et al.* (1983) avaient découvert s'était l'apparition et la disparition synchronisées de protéines avec les divisions lors du clivage embryonnaire précoce des échinides. Dans les débuts des années 1990, la réalisation que dans diverses cellules eucaryotes les cyclines forment un complexe avec des CDKs (Booher *et al.*, 1989 ; Draetta *et al.*, 1989 ; Gautier *et al.*, 1990 ; Meijer *et al.*, 1989 ; Wittenberg *et al.*, 1990) a marqué la naissance de l'ère moderne dans la recherche du cycle cellulaire. Les cyclines sont définies par leur aptitude à se lier et à activer une CDK. Les cyclines sont souvent reconnues par la présence d'un domaine conservé, nommé la boîte de la cycline, un élément constitué de cinq hélices alpha

(Kobayashi *et al.*, 1992 ; Noble *et al.*, 1997). Cette structure conservée est connue pour interagir avec le motif PSTAIRE et les régions de la boucle T de la CDK. En effet, l'affinité entre Cdc28 et les cyclines est favorisée grâce à la phosphorylation de la boucle T de Cdc28 (Kaldis *et al.*, 1996). Chez la levure bourgeonnante, Cdc28 est connue pour interagir avec 9 différentes cyclines au cours du cycle cellulaire. Comme mentionné auparavant, l'association d'une cycline à une CDK est essentielle pour l'activation de la kinase. Le schéma de la figure 1.6a permet de bien illustrer l'expression et la dégradation des différentes cyclines dans le cycle cellulaire de *Saccharomyces cerevisiae*. Dans les prochaines sections, les deux familles de cyclines seront présentées : la famille des cyclines de la phase G1 (Cln1-3) et la famille des cyclines de type B (Clb1-6).

#### **1.3.3.1 La famille des cyclines de la phase G1 (Cln1-3)**

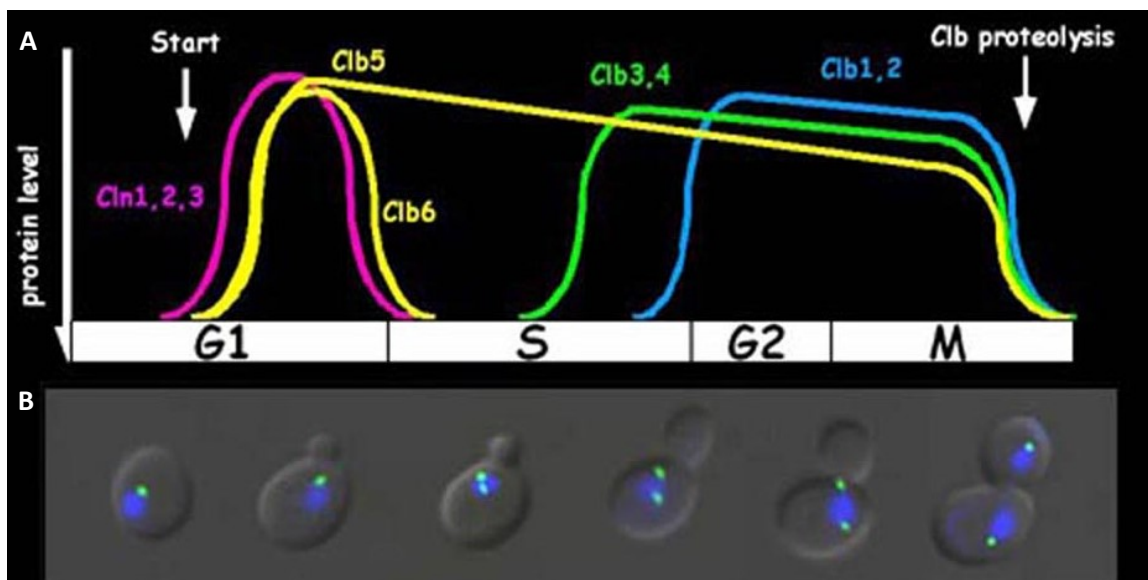
Parmi les neuf cyclines qui interagissent avec Cdc28 au cours du cycle cellulaire, trois d'entre elles appartiennent à la famille de cyclines de la phase G1 (figure 1.6a), nommée Cln. Il a été noté que les cellules de la levure peuvent tolérer la perte de deux gènes *CLN* à condition que le troisième soit exprimé, ainsi, la tripe délétion des *CLN* est non viable. En effet, la progression à travers la phase G1 et le point de Départ (ou « START » en anglais) du cycle cellulaire, qui implique l'émergence de bourgeon, la duplication des corps polaires du fuseau et l'activation de l'expression des cyclines de type B, nécessitent au moins une des cyclines de la phase G1 (Cross, 1990 ; Hadwiger *et al.*, 1989 ; Richardson *et al.*, 1989). Les complexes Cln-Cdc28 stimulent indirectement la synthèse de l'ADN par la protéolyse accélérée de l'inhibiteur Sic1 des complexes Clb-Cdc28. Les mécanismes par lesquels les complexes Cln-Cdc28 favorisent la formation de bourgeon et la duplication des corps polaires du fuseau ne sont pas encore connus. Bien qu'une des cyclines Cln puisse substituer pour les autres, elles sont connues pour différer dans leurs fonctions, leurs propriétés et leur régulation. Par exemple, Cln1, mais pas

Cln2, module l'augmentation de la taille des cellules en bourgeonnement en réponse au glucose (Flick *et al.*, 1998 ; Tokiwa *et al.*, 1994).

Les cyclines *CLN1* et *CLN2* sont identiques à 57% et l'homologie augmente à 72% si seule l'extrémité N-terminale qui contient la boîte de cycline est prise en considération. La transcription des gènes de *CLN1* et *CLN2* est maximale durant la phase G<sub>1</sub>/S. De plus, l'expression de ses deux gènes a été attribuée au facteur de transcription SBF (Anderson et Lopes, 1996 ; Andrews et Measday, 1998). La déstabilisation de ses cyclines est faite par un mécanisme dépendant d'ubiquitination, une modification post-traductionnelle à l'extrémité C-terminale, ce qui induit leur dégradation par la protéasome 26S (Lankers *et al.*, 1996 ; Skowyra *et al.*, 1999 ; Tyers *et al.*, 1992).

Pour ce qui est de la cycline *CLN3*, elle est plus identique aux séquences des gènes de *CLB5* et *CLB6* que celles de *CLN1* (~20% identique) et *CLN2* (25% identique). L'homologie entre les séquences est plus grande dans la région de la boîte de cycline. Contrairement aux autres cyclines, la transcription de *CLN3* n'est pas fortement périodique par rapport au cycle cellulaire, mais il y a une petite augmentation par rapport à son niveau de base à la frontière des phases M/G<sub>1</sub> (Cross et Blake, 1993 ; Tyers *et al.*, 1993). En effet, la transcription du gène de *CLN3* est détectable tout au long du cycle cellulaire à un faible niveau. Par contre, la traduction de Cln3 est réprimée au début de la phase G<sub>1</sub> par la protéine Whi3 qui séquestre l'ARNm de Cln3 au niveau du réticulum endoplasmique (Gari *et al.*, 2001). Tout comme *CLN1* et *CLN2*, *CLN3* possède une séquence à l'extrémité C-terminale qui le rend sensible à la dégradation par la protéolyse (Lanker *et al.*, 1996 ; Skowyra *et al.*, 1999 ; Tyers *et al.*, 1992). Le complexe Cln3-Cdc28 est connu pour contrôler les programmes transcriptionnels et fonctionne en amont de Cln1 et Cln2 (Tyers *et al.*, 1993 ; Marini et Reed, 1992). En effet, il est estimé que *CLN3* est 5 à 100 fois moins abondant et l'activité spécifique du complexe Cln3-Cdc28 est 2 à 20 fois plus faible, que les paramètres respectifs obtenus pour Cln1 et Cln2 (Levine *et al.*, 1996 ; Tyers *et*

*al.*, 1993). De plus, l'activité de Cln3-Cdc28 a été démontrée pour être importante pour l'activation de gènes médiée par SBF (Andrews et Moorw, 1992a ; Andrews et Moorw, 1992b ; Apone *et al.*, 1996). Cln3-Cdc28 phosphoryle Whi5, un répresseur transcriptionnel de SBF. Cette phosphorylation induit l'exportation nucléaire de SBF, ce qui permet d'induire la transcription des gènes de *CLN1* et *CLN2* (Arellano et Moreno, 1997 ; Aristarkhov *et al.*, 1996). Il a été démontré que l'activité de Whi5 est aussi inactivée par une boucle à rétroaction positive par l'activité des complexes Cln1/2-Cdc28, ainsi favorisant l'expression de *CLN1*, *CLN2* et *CLB5* (Arndt *et al.*, 1989 ; Arvai *et al.*, 1995). Ces résultats supportent l'hypothèse que le complexe Cln3-Cdc28 joue un rôle unique dans la phase G<sub>1</sub> en tant qu'activateur de la transcription de *CLN1* et *CLN2*.



**Figure 1.7 (a) Schéma des niveaux protéiques des cyclines (Cln1-3 et Clb1-6) dans les différentes phases du cycle cellulaire. (b) Suivi des différents stades de division de la levure bourgeonnante, de l'ADN (bleu) et des centrosomes (vert) dans le temps.**

### 1.3.3.2 La famille des cyclines de type B (Clb1-6)

La deuxième famille de cyclines se nomme les cyclines de type B. Les six cyclines de type B, Clb1-6, sont généralement subdivisées en trois paires en fonction de l'homologie des séquences et de la régulation transcriptionnelle (figure 1.6a). Tout comme les cyclines de la phase G<sub>1</sub>, les fonctions des membres de cette famille se chevauchent partiellement.

#### 1.3.3.2.1 Clb5 et Clb6

Dans ce mémoire les cyclines Clb5 et Clb6 sont identifiées comme des cyclines de la phase S précoce. La séquence de gènes des cyclines *CLB5* et *CLB6* sont identique à 50%. La transcription des gènes de *CLB5* et *CLB6* atteint un maximum durant la phase G<sub>1</sub>/S. En effet, les gènes de *CLB5* et *CLB6* sont exprimés en même temps que les gènes de *CLN1* et *CLN2* (Epstein et Cross, 1992 ; Kühne et Linder, 1993 ; Schwob et Nasmyth, 1993). L'activation de la transcription de ses deux gènes est connue pour être sous le contrôle de MBF (Andrews et Herskowitz, 1989). Sous des conditions de croissance normale, Clb5 et Clb6 ne sont pas en mesure d'accomplir toutes les fonctions pour faire le passage de la phase G<sub>1</sub>, car elles sont maintenues dans un état inactif par la protéine inhibitrice Sic1 (Schwob *et al.*, 1994). Ce n'est que suite à la phosphorylation et la déstabilisation de Sic1 par Cln1/2-Cdc28 que les cyclines de la phase S précoce en association avec Cdc28 auront leur activité. Clb5 possède une boîte de destruction (Epstein et Cross, 1992 ; Kühne et Linder, 1993 ; Schwob et Nasmyth, 1993) qui permet au complexe Clb5-Cdc28 d'avoir une activité jusqu'en anaphase où elle sera dégradée ensuite par protéolyse (Basco *et al.*, 1995 ; figure 1.6a). Or, Clb6 est dégradé à la frontière des phases G<sub>1</sub>/S (Dahmann *et al.*, 1995 ; figure 1.6a). Chez Clb6 l'ajout de chaînes de molécules ubiquitine qui favorise sa dégradation est faite par l'ubiquitine ligase SCF, or que pour Clb5 c'est par APC (pour *Anaphase Promoting Complex*). Une explication pour justifier le besoin de

la cellule à vouloir maintenir l'activité de Clb5-Cdc28 jusqu'en mitose peut être fournie par l'étude de Li *et al.* (2014). Les auteurs ont pu démontrer par leur méthode qui est basée sur la spectrométrie de masse que le complexe Clb5-Cdc28 cible et phosphoryle spécifiquement une phosphatase essentielle antagoniste de Cdc28, la Cdc14. Cette phosphorylation fournit un moyen de moduler la balance entre l'activité de Cdc28 et de la phosphatase. Ainsi, la dégradation de Clb5 durant la mitose permet de maintenir l'activité de Cdc28 durant les phases S/G<sub>2</sub>/M et de favoriser la réinitialisation du cycle cellulaire suite à l'anaphase.

Le rôle principal des cyclines de la phase S précoce est l'initiation de la phase S dans un temps approprié (Schwob *et al.*, 1994). Aussi, elles permettent de prévenir une seconde initiation des origines de réplication qui ont déjà été initiées (Dahmann *et al.*, 1995) et de réguler négativement l'activité des Cln-Cdc28 (Basco *et al.*, 1995). En effet, alors que Clb5 est nécessaire pour une réplication efficace de l'ADN, Clb6 permet d'inhiber les programmes de transcription de la phase G<sub>1</sub> (Geymonat *et al.*, 2004). En effet, Clb6-Cdc28 permet une régulation additionnelle de SBF et de MBF, par la phosphorylation de leur sous-unité Swi6, ainsi favorisant leur exportation nucléaire (Atherton-Fessler *et al.*, 1993). Consistent avec ses rôles, des cellules dépourvues de Clb5 ont une phase S prolongée (Epstein et Cross, 1992 ; Kühne et Linder, 1993 ; Schwob et Nasmyth, 1993). Il a été observé qu'un mutant *clb5Δ clb6Δ* a un long délai dans l'initiation de la phase S, mais suite à l'initiation la durée de la phase S est normale (Kühne et Linder, 1993 ; Schwob et Nasmyth, 1993). Gibson *et al.* (2004) ont observé qu'une diminution dans l'activité de Cdc28 due à la délétion de Clb5 et Clb6 conduisait à une activation de la DDR, ce qui indique la formation de lésions à l'ADN et une capacité réduite de réparation en absence de ces deux cyclines.



#### 1.3.3.2.2 Clb3 et Clb4

Les séquences de *CLB3* et *CLB4* sont identiques à 62%. Les transcrits de *CLB3* et *CLB4* apparaissent près du début de la phase S, après que le transcrit de *CLB5* et *CLB6* atteignent un maximum, et restent élevés jusqu'à la fin de l'anaphase (Epstein et Cross, 1992 ; Fitch *et al.*, 1992 ; Richardson *et al.*, 1992 ; figure 1.6a). Les régions consensus de la boîte de destruction de ces deux cyclines se retrouvent à l'extrémité où la séquence des acides aminés est la moins homologue. L'ajout de chaînes d'ubiquitine facilitant la dégradation par la protéasome 26S est fait par l'APC. Des expériences où des mesures sur les niveaux absolus de l'activité de la protéine kinase dans des cellules asynchrones ont été analysées indiquent que Clb3-Cdc28 constitue la majorité de l'activité de Cdc28 (67%) et que la contribution de Clb4-Cdc28 est mineure. Le mutant *clb3Δ clb4Δ clb5Δ* n'est pas en mesure de former le fuseau mitotique et est non viable. Le mutant *clb3Δ clb4Δ clb5Δ clb6Δ* est également non viable, car il a de la difficulté à initier la phase S (Schwob et Nasmyth, 1993). Dans le mutant *clb5Δ clb6Δ*, il a été démontré que Clb3 et Clb4 peuvent initier la phase S. Elles semblent être impliquées dans la réplication de l'ADN, la formation du fuseau mitotique et dans la transition de la phase G<sub>2</sub>/M (Amon *et al.*, 1993 ; Richardson *et al.*, 1992).

#### 1.3.3.2.3 Clb1 et Clb2

Entre eux, les Clb1 et Clb2 sont identiques à 78% et leur boîte de destruction se retrouve dans le terminus où il y a le moins d'homologie dans leurs séquences. Clb1 et Clb2 sont ciblés pour la dégradation par la protéasome 26S de la même manière que les cyclines Clb5, Clb3 et Clb4. L'activation et l'inactivation de Cdc28 sont nécessaires pour la progression appropriée du cycle cellulaire, puisque des mutants Clb2 dépourvus de la boîte de destruction ne sont pas en mesure de quitter la phase M (Ghiara *et al.*, 1991 ; Surana *et al.*, 1993 ; figure 1.6a). Les cyclines Clb1

et Clb2 sont exprimées durant la phase G<sub>2</sub>/M et elles sont dégradées en anaphase (Mendenhall et Hodge, 1998 ; Seufert *et al.*, 1995). Les transcrits de *CLB1* et *CLB2* atteignent un maximum 10 minutes avant l'anaphase (Fitch *et al.*, 1992 ; Ghiara *et al.*, 1991 ; Richardson *et al.*, 1992 ; Surana *et al.*, 1991). Le complexe Clb2-Cdc28 est fortement régulé par Swe1. L'inhibition de Clb2-Cdc28 permet à la cellule de prévenir une entrée prématurée dans la mitose (Breedon et Nasmyth, 1987). Swe1 est aussi connu pour réguler l'activité de Clb3/4-Cdc28, mais à un niveau modéré. Swe1 est à son tour régulé par l'activité de Cdc28. Des analyses des niveaux absolus de l'activité de la protéine kinase indiquent que Clb2-Cdc28 constitue la majorité (85%) de l'activité de Cdc28 dans des cellules arrêtées en mitose, or que Clb1-Cdc28 est une composante mineure (Grandin et Reed, 1993). Phénotypiquement, *CLB2* est le gène le plus important de la famille des cyclines de type B. Les mutants *clb2Δ* sont plus allongés que la forme circulaire habituelle de la levure bourgeonnante (Epstein et Cross, 1992 ; Fitch *et al.*, 1992 ; Richardson *et al.*, 1992 ; Surana *et al.*, 1991). Les combinaisons de délétions *clb1Δ clb2Δ* et *clb2Δ clb3Δ* sont létales, or que les combinaisons *clb2Δ clb4Δ* et *clb2Δ clb5Δ* sont viables. Le mutant *clb1Δ* n'a aucune évidence de phénotype mitotique et le mutant *clb1Δ clb3Δ clb4Δ* a un faible défaut mitotique (Amon *et al.*, 1993 ; Epstein et Cross, 1992 ; Fitch *et al.*, 1992 ; Ghiara *et al.*, 1991 ; Richardson *et al.*, 1992 ; Surana *et al.*, 1991). Consistent avec ces résultats, il a été démontré que Clb2-Cdc28 est important pour l'élongation du fuseau (Lew et Reed, 1993).

### 1.3.3.3 La spécificité des complexes cyclines-Cdc28

Comme mentionné plus haut, chez la levure bourgeonnante, la kinase Cdc28 est activée par l'association à neuf différentes sous-unités de cyclines. Il est proposé que le besoin de multiples cyclines soit probablement avantageux, car leur transcription et leur modification post-traductionnelle sont régulées indépendamment, ce qui favorise un contrôle flexible du cycle cellulaire. L'abondance des cyclines est régulée par leur expression et leur dégradation. Par

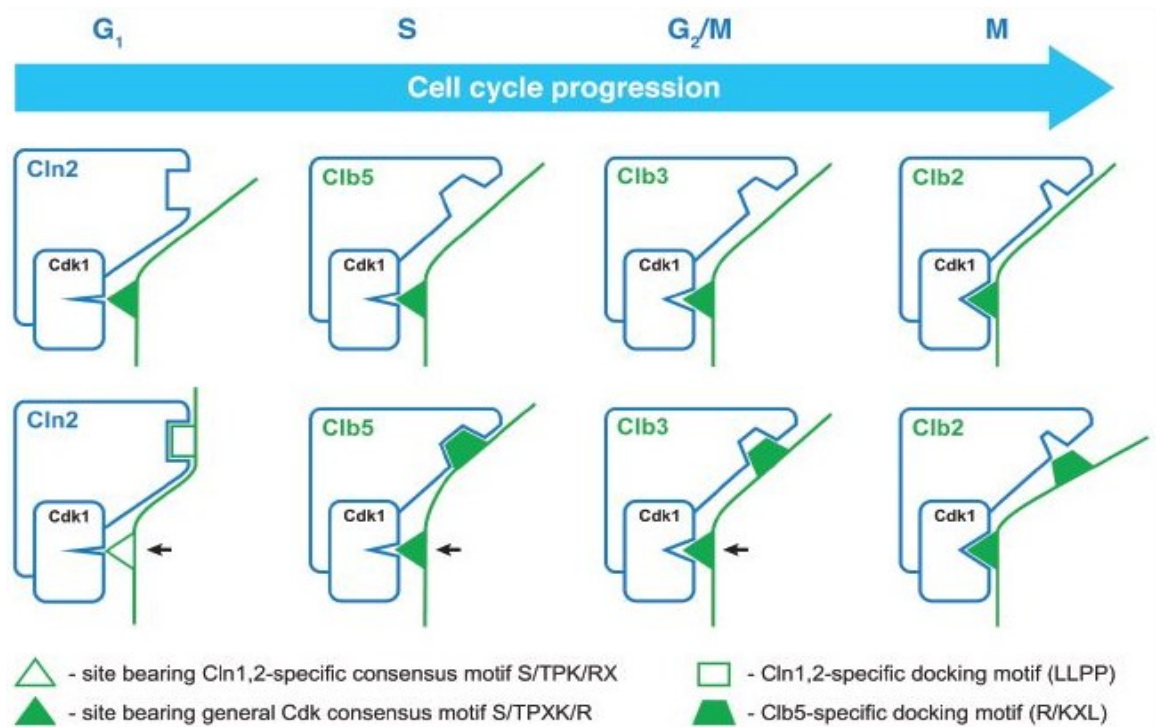
conséquent, l'activité de Cdc28 sera également affectée. Selon le modèle quantitatif, fondé sur des études réalisées chez la levure à fission *Shizosaccharomyces pombe*, seule l'activité croissante de cycline-Cdk, pas la spécificité envers les protéines cibles, est responsable du déclenchement des différents événements du cycle cellulaire (Stern et Nurse, 1996 ; Coudreuse et Nurse, 2010). Ce modèle suppose qu'il y a des différences majeures dans les niveaux de cyclines nécessaires pour promouvoir les différentes phases du cycle cellulaire. Les études quantitatives chez la levure bourgeonnante ont démontré que l'abondance de différentes cyclines est en fait très similaire, suggérant que le niveau de cycline-Cdc28 active ne change pas de façon significative au cours du cycle cellulaire (Cross *et al.*, 2002). Des études antérieures faites chez la levure bourgeonnante sur la spécificité des cyclines envers différents substrats n'étaient pas concluantes (Bloom et Cross, 2007). Certaines études ont suggéré des chevauchements significatifs de substrats phosphorylés par différents complexes cycline-Cdc28, puisque la létalité des mutants ayant des délétions de toutes les cyclines de type B peut être supprimée par l'expression ectopique de Clb1 (Haase et Reed, 1999). Une expression ectopique d'une cycline consiste à faire exprimer un gène de cycline donnée dans une cellule ayant des délétions dans d'autres gènes de cyclines, ce qui mène à son expression dans des phases où la cycline n'est pas normalement présente. De plus, la surexpression de *CLB5* ou la délétion de *SIC1* supprime la létalité des souches ayant des délétions des cyclines de la phase G<sub>1</sub> (Epstein et Cross, 1992 ; Schwob *et al.*, 1993 ; Tyers M, 1996). Par contre, d'autres études génétiques ont démontré que les gènes de cyclines ne sont pas tout à fait interchangeables, car le remplacement de *CLB5* avec *CLB2* provoque de défauts de réplication (Cross *et al.*, 1999 ; Cross et Jacobson, 2000 ; Donaldson, 2000). Pareillement, une étude menée par Schwob *et al.* (1993) a démontré que les cyclines qui sont exprimées tôt dans le cycle ne sont pas en mesure d'accomplir les fonctions des complexes cycline-Cdk1 présents en fin de cycle (Schwob et Nasmyth, 1993). Des analyses par spectrométrie de masse ont permis d'identifier des protéines liant spécifiquement les cyclines Cln2, Clb2, Clb3 et Clb5 (Archambault *et al.*, 2004). Les protéines identifiées dans cette étude avaient une fonction soit en amont, soit en aval des complexes cycline-Cdk1, ce qui indique à la fois que, la régulation et l'interaction des complexes cycline-Cdc28 avec leurs cibles, sont spécifiques (Archambault *et al.*, 2005).

Ensemble, ces résultats ont suggéré que la faculté des cyclines de substituer l'un pour l'autre est limitée et qu'il existe une spécialisation importante dans la capacité des cyclines de cibler différents substrats.

Ce n'est que dans la fin des années 2000, que l'importance de la capacité des cyclines à cibler spécifiquement les substrats de Cdc28 et d'initier différents événements du cycle cellulaire avait été mise en évidence. Loog et Morgan (2005) ont identifié, parmi plus de 150 protéines cibles de la Cdk1, les substrats phosphorylés préférentiellement par Clb5-Cdc28 plutôt que par Clb2-Cdc28 (Loog et Morgan, 2005). Près de 40 protéines étaient phosphorylées de façon plus efficace par Clb5-Cdc28. Parmi eux, les protéines Sld2, Cdc6, Orc6 et Mcm3 qui sont impliquées dans l'initiation de la réplication d'ADN ont été trouvées parmi les substrats spécifiques pour la cycline Clb5. Notamment, la spécificité de Clb5 dépende de l'interaction entre un domaine hydrophobe de Clb5 avec une courte séquence présente dans le substrat (RXL, contenant arginine et leucine) (Loog et Morgan, 2005). La séquence RXL constitue un site de reconnaissance ou site d'amarrage (du terme anglais «*docking site*») caractéristique pour les substrats de la cycline Clb5 et n'est pas présente dans les substrats de la cycline mitotique Clb2. Récemment, d'autres études ont pu identifier un site d'amarrage, autre que RXL, spécifique pour les cyclines Cln1 et Cln2 impliquées dans la transition G<sub>1</sub>/S, mais pas pour les cyclines de phases G<sub>1</sub>, S et M (Bhaduri et Pryciak, 2011 ; Kõivomägi *et al.*, 2011). Ce site, lié de manière spécifique par la cycline Cln2, était trouvé dans certaines protéines de signalisation, comme Ste5 et Ste20, impliquées dans la réponse aux phéromones, mais aussi dans certaines protéines régulatrices de la transition G<sub>1</sub>/S, comme Whi5 et Sic1. La liaison spécifique de la cycline au site d'amarrage augmente l'efficacité de phosphorylation du substrat par Cdc28. De plus, Cln2-Cdc28 manifeste également une spécificité vers le site consensus reconnu par Cdc28, suggérant que la cycline non seulement dirige la kinase vers le substrat, mais influence la sélectivité de son site actif pour permettre la phosphorylation de séquences consensus distinctes (Kõivomägi *et al.*, 2011). Les résultats et les conclusions principales de ces études ont été récemment confirmés en utilisant une nouvelle approche basée sur l'immunoprécipitation des complexes

actifs cycline-Cdc28 couplée à la spectroscopie de masse (Li *et al.*, 2014). Cette étude a démontré que chacun des complexes Cln2-Cdc28 et Clb5-Cdc28 cible ses propres substrats spécifiques pour phosphorylation (il y avait juste une protéine en commun sur 20 substrats caractérisés pour les deux cyclines). Finalement, en utilisant une méthode basée sur la complémentation des fragments de protéines, Ear *et al.* (2013) a démontré la dépendance de la phosphorylation de plusieurs substrats de Cdc28 d'une cycline en particulier (Ear *et al.*, 2013). Ainsi, l'ensemble de ces études récentes nous indique que chacun des complexes cycline-Cdc28 peut accéder à des cibles précises grâce à des interactions spécifiques cycline-substrat et que l'activation ordonnée et robuste des événements dans le cycle cellulaire dépende du changement graduel de la spécificité des cyclines.

Le modèle actuel expliquant comment la spécificité des complexes cycline-Cdc28 vers différents substrats peut réguler la phosphorylation sélective de ces substrats et, respectivement, l'exécution ordonnée des événements durant le cycle cellulaire est illustré dans la figure 1.8. Ce modèle propose que i) les complexes cycline-Cdc28 augmentent graduellement leur activité et leur spécificité vers le site consensus classique (la rangée du haut), ii) les cyclines utilisent des sites d'amarrage spécifiques pour se fixer à leurs substrats particuliers et augmenter l'efficacité de phosphorylation et iii) certaines cyclines, par exemple les cyclines G<sub>1</sub>/S, Cln1 et Cln2, peuvent moduler la spécificité du site actif de Cdc28 de manière qu'elle soit en mesure de reconnaître et de phosphoryler des sites consensus non classiques.



**Figure 1.8 Représentation schématique expliquant les changements dans la spécificité de Cdc28 (Cdk1) envers différents substrats durant le cycle cellulaire.** Le site actif de Cdk1 est représenté par une ouverture sous forme d'un triangle. Les sites de reconnaissance des cyclines sont représentés par un trou en forme de rectangle (Cln2) et de différentes grandeurs de trapèze (Clb5, Clb3 et Clb2). (Kõivomägi et Loog, 2011)

## 1.4 L'OBJECTIF DE TRAVAIL

Notre laboratoire s'intéresse aux rôles des systèmes cellulaires de réparation d'ADN dans le maintien des télomères. Les télomères qui sont composés de complexes nucléoprotéiques permettent la protection des extrémités des chromosomes eucaryotes contre la dégradation. Il a été observé que la déstabilisation des télomères, induite par l'inactivation de la protéine Cdc13 dans les cellules *cdc13-1*, conduit à la résection extensive et non contrôlée des extrémités des chromosomes. Cette résection est sous le contrôle de la principale kinase cycline-dépendante du cycle cellulaire, Cdc28, en collaboration avec les cyclines de type B. De plus, des études récentes ont permis de démontrer la spécificité d'activité des différents complexes cycline-Cdc28 envers différents substrats à des moments précis dans le cycle cellulaire. À partir de ses observations, nous avons émis l'hypothèse que l'une des kinases Clb-Cdc28 est impliquée dans la résection des télomères déprotégés dans les cellules *cdc13-1*. Ainsi, mon objectif a été de caractériser les complexes cycline-Cdc28 dans la résection des télomères déprotégés.

## CHAPITRE 2

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

#### 2.1 CONSTRUCTION DE SOUCHES

Les souches de levure (*Saccharomyces cerevisiae*) utilisées lors de ces essais sont d'haploïdes de type sexué A ou  $\alpha$  du fond génétique (background) BF264-15DU (*ade1 arg4 his2 leu2-3, 112 trp1-1 ura3 $\Delta$ ns*) (Reed *et al.*, 1985). Les cultures de levure ont été maintenues dans milieu YEP (1% yeast extract, 2% Bacto Peptone, 0.005% adénine) complété avec 2% de dextrose (YEPD) ou galactose (YEPG) comme source de carbone. Un grand nombre des souches nous ont été gracieusement fournies par notre collaborateur Dr Éric Bailly du Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM), tandis que d'autres nous avons obtenues par croisements comme décrits ci-dessous. Le nom de ses souches portant des différentes délétions des cyclines de type B (génotype) est regroupé et présenté dans les tableaux 2.1 et 2.2. Chacun de ces génotypes a été combiné soit avec l'allèle sauvage du gène codant la protéine Cdc13p, qui nous servira de contrôle, soit avec l'allèle thermosensible *cdc13-1*.



**TABEAU 2.1 Énumération des souches et leur génotype dans leur groupe respectif.**

	1 <sup>er</sup> Groupe	2 <sup>ème</sup> Groupe	3 <sup>ème</sup> groupe
	Phase S précoce	Phase S	Phase M
<b>Contrôles</b>	<i>WT</i> et <i>cdc13-1</i>	<i>WT</i> , <i>GAL-CLB5</i> , <i>cdc13-1</i> et <i>cdc13-1 GAL-CLB5</i>	<i>GAL-CLB1</i> et <i>cdc13-1 GAL-CLB1</i>
<b>Simple délétion</b>	<i>clb5Δ</i> et <i>clb6Δ</i>	<i>clb3Δ</i> ; <i>clb4Δ</i> ; <i>clb5Δ</i> et <i>clb6Δ</i>	<i>clb1Δ</i> et <i>clb2Δ</i>
<b>Double délétion</b>	<i>clb5,6Δ</i>	<i>clb3,4Δ</i> ; <i>clb3,5Δ</i> ; <i>clb3,6Δ</i> ; <i>clb4,5Δ</i> ; <i>clb4,6Δ</i> et <i>clb5,6Δ</i>	<i>clb1,2Δ GAL-CLB1</i>
<b>Triple délétion</b>		<i>clb3,4,5Δ</i> ; <i>clb3,4,6Δ</i> ; <i>clb3,5,6Δ</i> et <i>clb4,5,6Δ</i>	<i>clb1,2,3Δ GAL-CLB1</i> et <i>clb1,2,4Δ GAL-CLB1</i>
<b>Délétion de toutes les cyclines</b>		<i>clb3,4,5,6Δ GAL-CLB5</i>	<i>clb1,2,3,4Δ GAL-CLB1</i>

**TABEAU 2.2 Liste des souches avec leur génotype complet.**

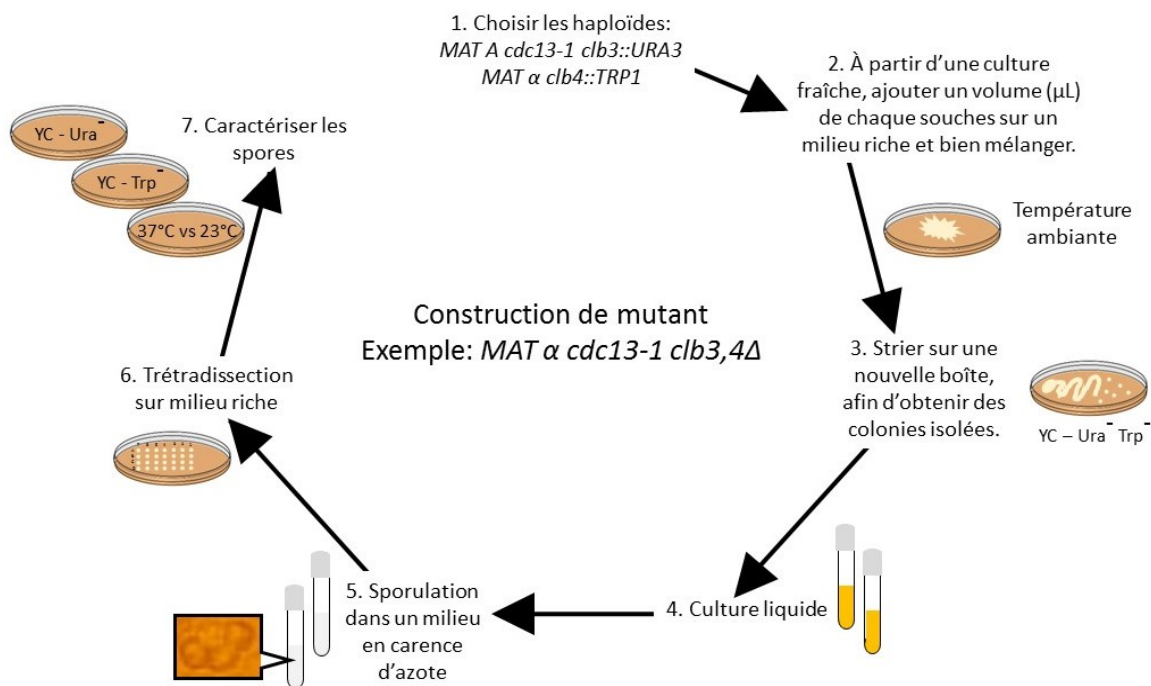
Souche	Génotype	Source
YE46	WT ( <i>MATα bar1Δ ade1 arg4 his2 leu2-3, 112 trp1-1 ura3Δns</i> )	E. Bailly
YE48	WT ( <i>MATα bar1Δ arg4</i> )	
YE3552	WT ( <i>MAT? leu2::GAL-CLB5::LEU2</i> )	
YE3553		
MKY6	WT ( <i>MAT? leu2::GAL-CLB1::LEU2</i> )	Cette étude
MKY7		
YE1613	<i>MATα bar1 cdc13-1 CLN2-3HA::URA3</i>	E. Bailly
YE1615	<i>MATα cdc13-1</i>	
MKY9	<i>MATα cdc13-1 leu2::GAL-CLB5::LEU2</i>	Cette étude
MKY10	<i>MATα cdc13-1 leu2::GAL-CLB5::LEU2</i>	
YE1663	<i>MATα cdc13-1 clb3::TRP1</i>	E. Bailly
YE1803	<i>MATα cdc13-1 clb4::HIS2</i>	
YE2724	<i>MATα bar1 cdc13-1 clb5::ARG4</i>	
YE2850	<i>MATα bar1 cdc13-1 clb5::URA3</i>	
YE3623	<i>MATα bar1 cdc13-1 clb6::ADE1</i>	
MVY672	<i>MAT? cdc13-1 clb6::ADE1</i>	Cette étude

YE736	<i>MATa BAR1 clb1::URA3 clb2::LEU2 leu2::GAL-CLB1::LEU2</i>	E. Bailly
YE2715	<i>MATa BAR1 clb1::URA3 clb2::LEU2 leu2::GAL-CLB1::LEU2</i>	
YE2712	<i>MATa cdc13-1 clb1::URA3 clb2::LEU2 leu2::GAL-CLB1::LEU2</i>	
YE2713		
YE1807	<i>MATa clb3::TRP1 clb4::HIS2</i>	
YE1806	<i>MATa cdc13-1 clb3::TRP1 clb4::HIS2 ura3::TUB1-GFP</i>	
YE2849	<i>MATa BAR1 cdc13-1 clb3::TRP1 clb5::URA3</i>	
MVY644	<i>MAT? clb3::TRP1 clb6::ADE1</i>	Cette étude
MVY645		
MVY646	<i>MAT? cdc13-1 clb3::TRP1 clb6::ADE1</i>	
MVY647		
MKY20	<i>MAT? cdc13-1 clb4::HIS2 clb5::ARG4</i>	
MKY21		
MKY22	<i>MAT? cdc13-1 clb4::HIS2 clb5::ARG4 CLN2-3HA::URA3</i>	
MVY648	<i>MAT? clb4::HIS2 clb6::ADE1</i>	
MVY649		
MVY670	<i>MAT? cdc13-1 clb4::HIS2 clb6::ADE1</i>	
MVY673		
YE733	<i>MATa clb5::ARG4 clb6::ADE1</i>	E. Bailly
YE3368	<i>MATa bar1 clb5::TRP1 clb6::ADE1</i>	
YE2739	<i>MATa cdc13-1 clb5::ARG4 clb6::ADE1</i>	
YE2741	<i>MATa BAR1 cdc13-1 clb5::ARG4 clb6::ADE1</i>	
YE2846	<i>MATa bar1Δ clb3::TRP1 clb4::HIS2 clb5::URA3</i>	
YE3575	<i>MAT? clb3::TRP1 clb4::HIS2 clb5::ARG4 leu2::GAL-CLB5::LEU2</i>	
YE2843	<i>MATa bar1Δ cdc13-1 clb3::TRP1 clb4::HIS2 clb5::URA3</i>	
MKY23	<i>MAT? cdc13-1 clb3::TRP1 clb4::HIS2 clb5::ARG4 CLN2-3HA::URA3</i>	Cette étude
YE3665	<i>MATa bar1Δ cdc13-1 clb3::TRP1 clb4::HIS2 clb5::ARG4 CLB6-9MYC::KAN leu2::GAL-CLB5::LEU2</i>	E. Bailly
YE3666		
MKY24	<i>MAT? clb3::TRP1 clb4::HIS2 clb6::ADE1</i>	Cette étude
MVY674		
YE3577	<i>MAT? clb3::TRP1 clb4::HIS2 clb6::ADE1 leu2::GAL-CLB5::LEU2</i>	E. Bailly
YE2804	<i>MATa cdc13-1 clb3::TRP1 clb4::HIS2 clb6::ADE1</i>	
YE3664	<i>MAT? cdc13-1 clb3::TRP1 clb4::HIS2 clb6::ADE1</i>	
MVY675	<i>MAT? cdc13-1 clb3::TRP1 clb4::HIS2 clb6::ADE1</i>	Cette étude
MVY676		
MVY624	<i>MATa cdc13-1 clb3::TRP1 clb4::HIS2 clb6::ADE1</i>	
MVY625	<i>leu2::GAL-CLB5::LEU2</i>	

YE2847	<i>MATa bar1 clb3::TRP1 clb5::URA3 clb6::ADE1</i>	E. Bailly
MKY25	<i>MAT? clb3::TRP1 clb5::ARG4 clb6::ADE1</i>	Cette étude
YE3578	<i>MAT? clb3::TRP1 clb5::ARG4 clb6::ADE1 leu2::GAL-CLB5::LEU2</i>	E. Bailly
YE3625	<i>MATa BAR1 cdc13-1 clb3::TRP1 clb5::ARG4 clb6::ADE1</i>	
YE3668	<i>MATa bar1::URA3 cdc13-1 clb3::TRP1 clb5::ARG4 clb6::ADE1</i>	
MVY635	<i>MATa cdc13-1 clb3::TRP1 clb5::ARG4 clb6::ADE1</i>	Cette étude
MVY637	<i>MATa cdc13-1 clb3::TRP1 clb5::ARG4 clb6::ADE1</i>	
MVY640	<i>leu2::GAL-CLB5::LEU2</i>	
MVY677	<i>MAT? clb4::HIS2 clb5::ARG4 clb6::ADE1</i>	
MVY632	<i>MATa bar1 clb4::HIS2 clb5::ARG4 clb6::ADE1 leu2::GAL-CLB5::LEU2</i>	
MVY634	<i>MATa clb4::HIS2 clb5::ARG4 clb6::ADE1 leu2::GAL-CLB5::LEU2</i>	
MKY26	<i>MAT? cdc13-1 clb4::HIS2 clb5::ARG4 clb6::ADE1</i>	
MVY631	<i>MATa cdc13-1 clb4::HIS2 clb5::ARG4 clb6::ADE1 leu2::GAL-CLB5::LEU2</i>	
YE732	<i>MATa BAR1 clb1::URA3 clb2::LEU2 clb3::TRP1 clb4::HIS2 leu2::GAL-CLB1::LEU2</i>	E. Bailly
YE2717	<i>MATa bar1 clb1::URA3 clb2::LEU2 clb3::TRP1 clb4::HIS2 leu2::GAL-CLB1::LEU2</i>	
YE2742	<i>MATa bar1 cdc13-1 clb1::URA3 clb2::LEU2 clb3::TRP1</i>	
YE2743	<i>clb4::HIS2 leu2::GAL-CLB1::LEU2</i>	
MVY622	<i>MATa clb3::TRP1 clb4::HIS2 clb5::ARG4 clb6::ADE1 leu2::GAL-CLB5::LEU2</i>	Cette étude
YE3644	<i>MAT? cdc13-1 clb3::TRP1 clb4::HIS2 clb5::ARG4</i>	E. Bailly
YE3645	<i>clb6::ADE1 leu2::GAL-CLB5::LEU2</i>	
MVY627	<i>MATa cdc13-1 clb3::TRP1 clb4::HIS2 clb5::ARG4 clb6::ADE1 leu2::GAL-CLB5::LEU2</i>	Cette étude
MVY630	<i>MAT? cdc13-1 clb3::TRP1 clb4::HIS2 clb5::ARG4 clb6::ADE1 leu2::GAL-CLB5::LEU2</i>	

La délétion des cyclines est faite à l'aide de l'insertion de marqueurs auxotrophiques dans le gène de la cycline selon les protocoles publiés (Wach *et al.*, 1994 ; Brachman *et al.*, 1998). L'auxotrophie est l'incapacité d'un organisme vivant à synthétiser un composant organique nécessaire à son développement. En effet, l'insertion d'un de ces marqueurs dans un gène de cycline complémente cette incapacité et permet aux cellules de pousser sur un milieu sélectif ne

possédant pas le composé en question. Ainsi, ceci nous permettra de suivre la délétion de cyclines lors de croisement de souches haploïdes et de sélectionner les souches possédant les délétions désirées. Nous avons croisé de cellules haploïdes de type sexué opposé portant chacune des mutations différentes pour former une souche diploïde A/a et ensuite appliqué une sélection sur un milieu synthétique complète (SC) dépourvu des acides aminés ou nucléotides désirés (Rose *et al.*, 1990 ; Guthrie et Fink, 1991). Afin d'illustrer les étapes de la technique, un exemple de la construction du mutant *MAT α cdc13-1 clb3,4Δ* est présenté dans la figure 2.1. Le croisement des souches haploïdes a lieu sur un milieu riche en nutriment. Dans mes expériences, tous les croisements ont eu lieu à température pièce afin de favoriser le croisement avec des souches contenant l'allèle *cdc13-1* thermosensible.



**Figure 2.1. Présentation schématique des étapes de la technique de croisement.** Dans cet exemple, les haploïdes *MAT A cdc13-1 clb3::URA3* et *MAT α clb4::TRP1* ont été choisis pour la construction du mutant *MAT α cdc13-1 clb3,4Δ*. Le milieu de pétrie qui a été servi pour le croisement des deux mutants et de la croissance des spores a été YEPD. Le milieu qui a été utilisé pour sélectionner les cellules diploïdes a été SC- Ura<sup>-</sup>Trp<sup>-</sup>. La culture liquide avant la sporulation a été du YEPD.

Après avoir choisi les deux souches haploïdes, une culture fraîche a été préparée et 20µL de chaque culture mélangée sur une pétrie YEPD, un milieu riche, est incubé à température pièce. Le croisement de souches GAL-CLB5/1 a été fait sur une boîte de pétrie YEPG. Afin de se débarrasser des cellules haploïdes, le produit de croisement a été strié sur un milieu sélectif qui ne possède pas les nutriments respectifs et incubés à température pièce ou à 30°C si l'une des souches haploïdes possédait l'allèle sauvage *CDC13*. Les génotypes désirés ont été obtenus après sporulation et dissection de tétrades méiotiques selon les protocoles établis (Rose, 1990 ; Guthrie et Fink, 1991). Les cellules diploïdes ont été lavées dans l'eau stérile avant d'être incubées à température pièce dans 0,5% KAc, un milieu de sporulation en carence d'azote, jusqu'au temps qu'on a observé l'apparition des tétrades sous microscope (3 à 4 jours en général). Les produits méiotiques ont été resuspendus et incubé dans 100µL d'une solution de zymolyase (0,5mg/mL) dans du SCE (1M Sorbitol, 100mM Acide citrique et 60mM EDTA, pH7,5) sur la paillasse pendant 15 min. Après dilution dans 800µL SCE, 15µL ont été transférés sur une boîte de milieu riche et les tétrades disséquées à l'aide d'un microscope à dissection (Zeiss Axio Scope.A1, Iéna, Allemagne). Les boîtes de pétrie contenant les spores isolées ont été incubées à température pièce jusqu'à ce qu'il y a la formation de colonies. Chaque spore a été caractérisée sur des milieux sélectifs qui permettent d'identifier le génotype de ces cellules haploïdes. La présence de l'allèle *cdc13-1* a été déterminée par une exposition à 32°C sur un milieu riche. Le type sexué des haploïdes a été déterminé par PCR comme décrite précédemment (Huxley C, TIG 1990).

## 2.2 ANALYSES DE CROISSANCE

Des cultures en phase exponentielle (entre 1 à  $1.2 \times 10^7$  cellules/mL) ont été obtenues à partir d'une culture dense fraîchement préparée. Ensuite, à partir de la culture en phase exponentielle et en phase stationnaire, une dilution à  $0.05 \times 10^7$  cellules par millilitre de milieu riche a été préparée et 100µL a été transférée dans un puits d'une plaque stérile à 96 puits. Compte tenu du

nombre de souches, les cultures diluées ont été déposées dans la plaque en duplicata ou en triplicata. À l'aide d'un lecteur de microplaque (Synergy HT, Bio-Tek, USA), la densité optique des cultures a été mesurée à chaque 10min à une longueur d'onde de 660nm pour une durée de 36h. L'expérience a été effectuée à des différentes températures, permissive (23°C), semi-permissive (28°C) ou restrictive (31°C) pour la croissance des cellules portant l'allèle *cdc13-1*. Les données mesurées dans Gen5 ont été exportées sous forme de tableau Excel. Les données ont été analysées par deux méthodes : aire sous la courbe ou le logiciel GrowthRates.

### 2.2.1 Analyse par aire sous la courbe

L'analyse de croissance des cultures de  $0,05 \times 10^7$  cellules par millilitre de milieu riche diluées à partir d'une culture en phase stationnaire a été calculée par une méthode de base de l'aire sous la courbe (AUC). L'AUC est une méthode non-paramétrique où le fitness est défini par le logarithme de l'AUC (McLellan *et al.*, 2012). Le calcul de l'aire sous la courbe a été fait dans Excel. L'équation qui a été utilisée est la suivante (figure 2.2):

$$AUC = \sum \frac{1}{2} (y_n + y_{n+1}) \Delta x$$

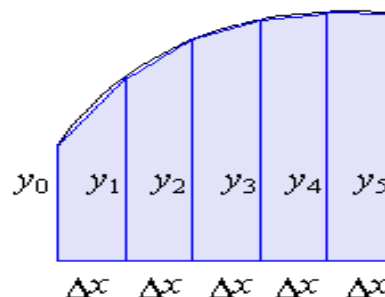
où

$\sum$  : somme

$\Delta x$  : intervalle de temps entre la lecture n et n+1

$y_n$  : densité optique à 660nm mesurée au temps n

$y_{n+1}$  : densité optique à 660nm mesurée au temps n+1



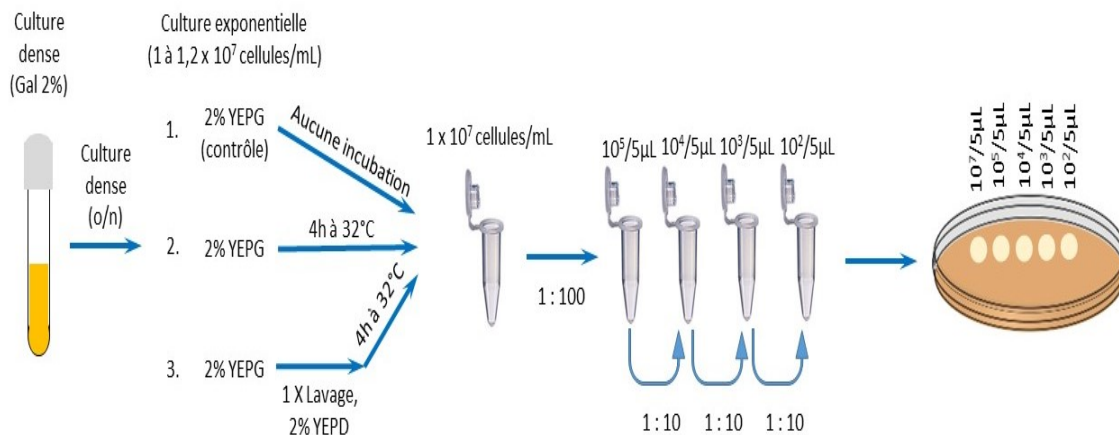
**Figure 2.2** Représentation schématique d'une courbe divisée dans 5 intervalles de temps égaux et où les valeurs de densité optique sont représentées par les variables  $y_n$  dans le but de calculer l'aire sous la courbe.

### 2.2.2 Analyse par le logiciel GrowthRates

L'analyse de croissance des cultures de  $0,05 \times 10^7$  cellules par millilitre de milieu riche diluées à partir d'une culture en phase exponentielle a été calculée par l'outil informatique GrowthRates (Hall *et al.*, 2013). Ce logiciel permet de calculer le taux de croissance ( $\text{min}^{-1}$ ) des courbes de croissance hétérogènes. Le taux de croissance permet d'étudier les changements dans le nombre d'individus dans une population dans un temps donné.

## 2.3 TESTS DE CROISSANCE SUR MILIEU SOLIDE

À partir d'une culture dense dans YEPG, trois cultures dans YEPG ont été préparées et incubées durant la nuit à 24°C. Lorsque les cultures ont atteint la phase exponentielle ( $1$  à  $1,2 \times 10^7$  cellules/mL), elles ont été réparties de la façon suivante: une partie a servi de contrôle et n'était pas soumise à l'étape de préincubation à température élevée, une deuxième partie a été préincubée à 32°C pendant 4h et, finalement, une autre partie a été lavée dans l'eau stérile, resuspendue dans YEPD pour réprimer l'expression du gène sous contrôle du promoteur *GALI,10* et incubée à 32°C pendant 4h. Suite à ces incubations, le volume de la culture exponentielle qui correspondait à  $1 \times 10^7$  cellules a été centrifugé et resuspendu dans 1mL d'eau stérile. Des dilutions de  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$  et  $10^2$  cellules/5 $\mu$ L dans d'eau stérile ont été préparées à partir du microtube de  $10^7$  cellules/mL. Finalement, 5 $\mu$ L de ces dilutions a ensuite été transféré doucement sur une pétrie, de façon à ce que le volume transféré forme un cercle. L'information sur la source de carbone et la température d'incubation des pétries sont décrites directement dans la légende des figures. Les différentes étapes de la technique du spot test ont été illustrées dans la figure 2.3.

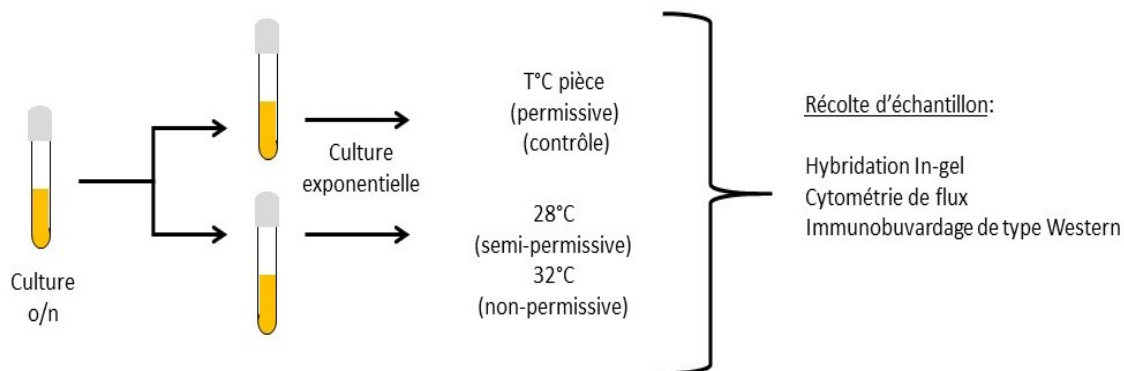


**Figure 2.3 Tests de croissance sur milieu solide par la technique «spot test».**

## 2.4 DÉPROTECTION DES TÉLOMÈRES ET RÉCOLTES D'ÉCHANTILLONS

Deux cultures (YEPD) en phase exponentielle ( $1 \text{ à } 1,2 \times 10^7$  cellules/mL) incubées à  $24^\circ\text{C}$  ont été obtenues à partir d'une culture incubée à  $24^\circ\text{C}$  durant la nuit. Pour une de ces cultures qui sert de contrôle, l'incubation à  $24^\circ\text{C}$  se poursuit pendant 2h30 supplémentaires. L'autre culture a été incubée soit à une température semi-permissive ( $28^\circ\text{C}$ ) ou non-permissive ( $32^\circ\text{C}$ ) pendant 2h30. Finalement, des échantillons ont été récoltés pour la quantification de l'ADN simple brin (ADN sb) aux télomères déprotégés, la cytométrie en flux pour déterminer la position dans le cycle cellulaire des cellules et l'immunobuvardage de type western. Après centrifugation, les culots cellulaires ont été conservés à  $-80^\circ\text{C}$ . Les échantillons pour cytométrie en flux ont été centrifugés à 13000rpm pendant 20sec et les cellules ont été resuspendues dans 1mL éthanol 70% froide. Les différentes étapes d'expérience ont été illustrées dans la figure 2.4.





**Figure 2.4 Récolte d'échantillons suite à la déprotection des télomères.**

## 2.5 LA TECHNIQUE DE L'HYBRIDATION NON DÉNATURANTE

La technique d'hybridation non dénaturante permet de visualiser l'ADN sb aux télomères à l'aide d'une sonde radiomarquée spécifique aux séquences télomériques. À l'aide d'un logiciel de quantification, tel ImageQuant, on est également en mesure de quantifier les signaux d'hybridation et, respectivement, les quantités d'ADN sb générées sous différentes conditions. Dans mon cas, la quantification des signaux est faite en prenant la piste au complet (voir figure 2.5).

### 2.5.1 Extraction et purification de l'ADN génomique

Les échantillons de cellules congelées ont été lavés avec 100µL eau stérile et transférée dans un microtube de 1,5mL stérile identifié. Les cellules ont été resuspend dans 200µL tampon de lyse (100mM Tris-HCl pH8, 50mM EDTA, 1% SDS et 250mM NaCl). Ensuite, nous avons ajouté des billes de verres stériles de 425-600µm de diamètre (Sigma-Aldrich, MO U.S.A.) de façon à

ce qu'il reste 2mm de liquide à la surface et le tube a été bien fermé avec du parafilm. La lyse mécanique a été faite à l'aide d'un homogénéisateur FastPrep® -24 (MP biomedicals, CA, USA) à une puissance de 4.5 pendant 60sec. Le lysat a été transféré dans un nouveau microtube de 1,5mL stérile en perçant le fond du tube avec une aiguille chauffée et d'une brève centrifugation. À ce lysat, 200µL de tampon de lyse et 400µL d'une solution de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (24:25:1) ont été bien mélangés par vortex et centrifugés à 13000rpm pendant 10min à température pièce. La phase aqueuse a été transférée dans un nouveau microtube et 1mL d'EtOH froide 100% a été ajouté, afin de permettre la précipitation de l'ADN génomique à -80°C pendant 1h. Le tube a été centrifugé à 13000rpm pendant 10min à température pièce et le culot a été lavé avec 500µL d'EtOH 70% froid. Le microtube a été incubé pendant 5 min sur la pailleasse et centrifugé à nouveau à 13000rpm pendant 10min. Le culot séché à l'air a été dissous dans 50µL TE (10mM Tris-HCl pH8 et 1mM EDTA) et traité avec 2,5µL RNaseA (10mg/mL) à 37°C pendant 1h. 150µL TNE (10mM Tris-HCl pH8, 100mM NaCl et 1mM EDTA) et 5µL Protéinase K (20mg/mL) ont été ajoutés et les échantillons incubés à 37°C pendant minimum 2h. Après une extraction au phénol/chloroforme/alcool isoamylique (24:25:1) et une deuxième au chloroforme/alcool isoamylique (24:1), la phase aqueuse a été transférée dans un nouveau tube stérile et l'ADN a été précipité avec 2 volumes d'EtOH froide 100% à -80°C. Finalement, l'ADN séché est dissous dans 40µL de TE et laissé à 4°C pour permettre l'homogénéisation de l'échantillon.

### **2.5.2 Préparation des échantillons**

Après une incubation durant la nuit à 4°C, on a dosé l'ADN à l'aide d'une courbe standard du phage λ dilué dans du TE (2; 1; 0,5; 0,25; 0,125 et 0µg/mL) dans une plaque noire à 96 puits. Dans un puits, 2µL de l'échantillon a été ajouté dans 200µL d'une solution de 1µg/mL Hoechst (10mg/mL) avec 1X TNE filtré pH7,4. La lecture de la fluorescence (360/460nm) a été faite à l'aide d'un lecteur de plaque Synergy HT (BioTek, VT U.S.A.). Le volume correspondant à

1µg d'ADN a été prélevé de l'échantillon et digéré avec l'enzyme de restriction XhoI (New England BioLabs) dans un volume final de 20µl. Dans ce volume final, 5µL du mélange réactionnel (Tampon NEB 4 1X, 100µg/mL BSA, 20ng RNaseA (10mg/mL) et 10u XhoI) ont été incubés durant la nuit à 37°C. Les produits de digestion ont été colorés avec 2µL colorant de chargement 10X.

### **2.5.3 Préparation des sondes radiomarquées**

#### **2.5.3.1 Préparation des sondes télomériques par marquage d'oligonucléotides**

Dans un microtube stérile, 11µL d'eau stérile, tampon PNK 1X, 200ng oligonucléotide (CA<sub>22</sub>: 5'-ACCACCACACACCCCACACCC) purifié par HPLC, 1µL Kinase T4 polynucléotide et 4µL γ-ATP<sup>32</sup> (Enzymatics, MA U.S.A.) ont été mélangés et ensuite incubés à 37°C pendant 1 heure. Après ce temps, 50µL TE (10mM Tris-HCl pH8 et 1mM EDTA) a été ajouté au mélange réactionnel et incubé à 65°C pendant 10min afin d'inactiver l'enzyme. Les nucléotides libres ont été éliminés à l'aide d'une micro colonne G-50 ProbeQuant™ (GE Healthcare) selon les instructions du fabricant et l'activité spécifique de la sonde radiomarquée a été vérifiée par un compteur à scintillation liquide (Beckman Coulter, CA U.S.A.).

#### **2.5.3.2 Préparation d'une échelle radiomarquée**

Dans un microtube stérile, 5µg d'une échelle moléculaire (New England Biolabs, MA, USA) et 30 unités de T4 ADN polymérase (Enzymatics, MA, USA) ont été mélangés dans le tampon fourni par la compagnie (50mM NaCl, 10mM Tris-HCl (pH7.9), 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT),

incubés 5 min. à température ambiante et placée sur la glace. Désoxyribonucléotides triphosphates (dATP, dGTP et dTTP; 200 $\mu$ M) froids ont été ajoutés, ainsi que 3 $\mu$ l  $\alpha$ -dCTP32 radiomarké (3000Ci/mmol), et l'incubation poursuivie à 30°C durant 5 min. Le désoxycytidine triphosphate (200 $\mu$ M) a été ajouté et le mélange a été incubé pendant 2 min à 37°C. Finalement, la T4 polymérase a été inactivé par l'ajout d'un volume égal (50 $\mu$ l) de sodium dodecyl sulfate (SDS) 1% et les produits radiomarkés ont été purifiés sur une micro colonne G-50 ProbeQuant™ (GE Healthcare, U.K). Après dilution dans 1% SDS, environ 20 000cpm de l'échelle radioactive ont été déposés sur le gel d'agarose à côté des échantillons d'ADN à analyser.

#### **2.5.4 Électrophorèse et hybridation dans gel natif**

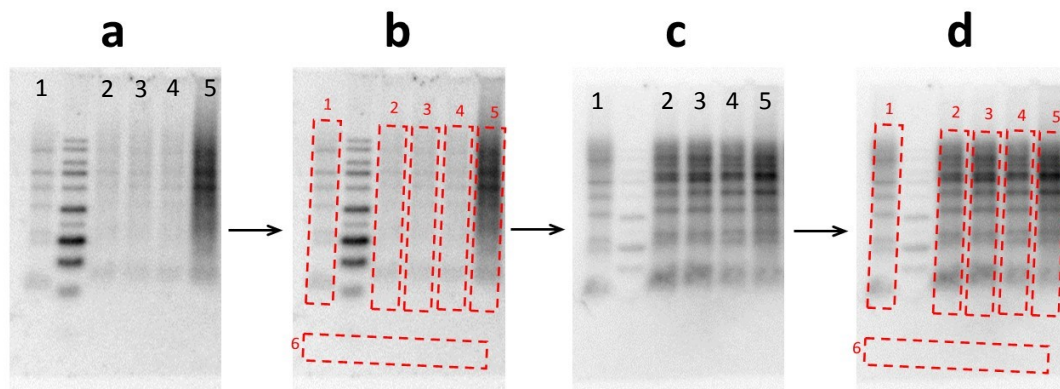
Les produits de digestion ont été migrés sur un gel d'agarose 0,75% dans le tampon TBE 1X (360mM Trizma Base, 355mM acide borique et 9mM EDTA, pH8,4) à 80V pendant 4 heures à température pièce. Ensuite, le gel d'agarose est coloré avec une solution de bromure d'éthidium (50 $\mu$ g/mL) afin de visualiser l'ADN digéré à l'aide d'une photodocumentation (MBI Lab equipment modèle BioVision1000, QUE, CAN). Le gel d'agarose a été séché à température ambiante à l'aide d'un sécheur de gel (ThermoSavant SGD200 Slab Gel Dryer, U.S.A.) de façon à ce qu'on a obtenu un gel déshydraté très mince (Dionne I, 1996). Ensuite, le gel séché a été scellé dans un sachet en plastique et hybridé à l'aide d'un oligonucléotide radiomarké (2 x 10<sup>6</sup> cpm par gel) spécifique aux séquences télomériques dans 20mL de tampon d'hybridation (SSC 5X, P-wash 0,1X (0,05mM pyrophosphate inorganique et 1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), Denhardts 5X, 2 $\mu$ L ATP 20mM et 2mg ADN de sperme de saumon dénaturé) et de 10 $\mu$ L sonde radiomarkée durant la nuit dans un bain marin à 37°C (FisherScientific modèle 220, 15-462-20). Le gel a été ensuite lavé avec du 0,25X SSC pH7 pendant 3 heures avec une faible agitation jusqu'à ce que le bruit de fond du gel a été inférieur à 100cpm (mesuré par lecteur de type Geiger GSM-500 (Wm.B. Johnson & Associates Inc., VA, USA). Le gel a été exposé sur un écran phosphore

luminophore dans une cassette d'exposition radiologique et les signaux ont été ensuite révélés par un phosphorimager Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare, U.K.). La quantification du signal dans chaque piste correspondant à la quantité d'ADN simple brin présent dans l'échantillon a été effectuée à l'aide du logiciel ImageQuant. Afin de normaliser les données par rapport à la quantité d'ADN total chargée dans chaque piste, les gels ont été dénaturés dans 500mL solution de dénaturation (150mM NaCl et 0,5M NaOH) à température pièce pendant 25min, neutralisés dans 500mL solution de neutralisation (150mM NaCl et 0,5M Tris-HCl pH8) à température pièce pendant 20min avec des faibles agitations et, finalement, rehybridés avec la même sonde radiomarquée. Après des lavages dans 0.25X SSC, les gels ont été exposés sur un écran phosphore et les signaux quantifiés par un phosphorimager comme décrit ci-dessus.

#### **2.5.5 Quantification des signaux**

Une fois que les écrans phosphore ont été révélés, l'image numérique du gel hybridé par une sonde spécifique CA-riche sous conditions non dénaturantes (figure 2.5a) nous a servie pour quantifier la quantité de l'ADN simple brin (figure 2.5b). Dans l'exemple de gel présenté dans la figure 2.5b, la piste 1 représente le contrôle yku70Δ. Les 4 pistes qui suivent correspondent à la souche type sauvage et *cdc13-1* incubées à 23°C (2 et 4, respectivement) et à 32°C (3 et 5, respectivement). À l'aide d'ImageQuant, les pistes ont été sélectionnées par un rectangle (figure 2.5b). Finalement, le bruit de fond (6) a été soustrait des signaux, afin d'obtenir la quantité d'ADN simple brin final. Le bruit de fond a également été soustrait par le logiciel en sélectionnant l'option «Local Average» dans la fenêtre de «Background correction inspector». ImageQuant va soustraire le bruit de fond environnant des régions sélectionnées (figure 2.5b). Les données mesurées dans ImageQuant ont été exportées sous forme de tableau Excel. À la suite de la dénaturation du gel et de la rehybridation avec la même sonde CA-riche (figure 2.5c), les pistes sont sélectionnées (figure 2.5d) et ils représentent cette fois-ci la quantité d'ADN totale. La soustraction du bruit de fond a été faite par l'option «Local Average» et les données

ont été exportées sous forme de tableau Excel. La quantité d'ADN simple brin a été normalisée avec l'ADN total. Finalement, la valeur obtenue a été divisée par la valeur normalisée du contrôle (yKu70Δ) afin que les résultats obtenus dans les différentes expériences puissent être comparables.



**Figure 2.5 Représentation schématique simplifiée de la quantification des signaux à partir des images numériques prises par le phosphorimager Typhoon FLA 9500.** a) L'image numérique d'un gel natif marqué avec une sonde spécifique aux répétitions télomériques et (b et d) la sélection de toute les pistes par le logiciel ImageQuant pour but de quantifier les signaux. c) L'image numériqued'un gel dénaturé et rehybridé avec la même sonde qu'en a).

L'équation qui a été utilisée est la suivante :

$$\frac{\text{Quantité simple brin (échantillon)}}{\text{Quantité d'ADN total}} / \frac{\text{Quantité simple brin du contrôle (ku)}}{\text{Quantité d'ADN total du contrôle}}$$

## 2.6 IMMUNOBUVARDAGE DE TYPE WESTERN

### 2.6.1 Extraction de protéines

Le culot cellulaire a été décongelé, lavé avec de l'eau stérile et resuspendue dans 1mL d'eau stérile. À partir de ce volume, 10µL a été servi pour prendre la lecture d'absorbance dans une plaque à 96 puits. La valeur de densité optique a servi pour équilibrer le nombre de cellules à travers d'échantillons et resuspendre les extraits protéiques de façon à ce qu'il y avait  $0,5 \times 10^7$  cellules dans 3µL d'échantillon. À partir de cette étape, toutes les manipulations ont eu lieu sur glace et l'extraction a été réalisée par un protocole publié et légèrement modifié (Knop *et al.*, 1999). Bref, 150µL d'une solution de 1,85M NaOH et 7,5% β-mercaptoéthanol a été ajouté dans le microtube contenant les cellules. Le tout a été mélangé par inversion et incubé pendant 15min. Ensuite, les protéines ont été précipitées avec l'ajout de 150µL TCA 55% froide suivi d'un mélange par inversion et une incubation de 10min. L'extrait protéique a été culoté suite à une centrifugation à 13000rpm pendant 10min. Le culot protéique a été laissé séché dans la hotte chimique pendant 5min et resuspendue dans tampon de Laemlli (62,5mM Tris pH6.8, 2% SDS, 10% glycérol, 0,01% bromophénol bleu et 0,05% β-mercaptoéthanol), soit le volume calculé et équilibré pour chaque échantillon. Les échantillons ont été conservés à -80°C et, juste avant l'analyse, 5µL de chaque échantillon a été transféré dans un nouveau microtube, et les protéines ont été dénaturées à 100°C pendant 2min avant d'être déposées sur le gel d'acrylamide.

### 2.6.2 Immunobuvardage

Des gels séparateurs de polyacrylamide à 8% et à 10% ont servi pour analyser les protéines Rad53 et Clb5, respectivement. L'électrophorèse des gels d'acrylamide a été effectuée à 170V pendant 50min ou jusqu'à ce que le bromophenol bleu sort du bas du gel dans un tampon de migration (5mM Tris-Base, 38,4mM Glycine et 0,02% SDS). Les protéines ont été transférées sur des membranes de nitrocellulose (Perkinelmer), dans un tampon de transfert (25mM Tris base, 192mM Glycine pH8,3 et 20% méthanol) à 100V, pendant 1h à 4°C. Ensuite, les membranes ont été colorées avec une solution de 3% Ponceau S et une photo des membranes colorées ont été prise par une photodocumentation (MBI Lab equipment modèle BioVision1000, QUE, CAN). Les membranes ont été bloquées pendant 1h (4 fois 15min) à température pièce dans une solution de blocage (PBS 1X pH7,4 (137mM NaCl, 2mM KCl, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et 1.8mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 0,1% Tween et 5% lait en poudre). Elles ont ensuite été incubées avec les anticorps primaires dilués dans la solution de blocage pendant toute la nuit à 4°C: anti-Rad53  $\gamma$ C-19 et anti-Rad53  $\gamma$ N-19 (Santa Cruz Biotechnology) dilué 1:500, anti-Clb5  $\gamma$ N-19 (Santa Cruz Biotechnology) dilué dans 1:500 et anti-Pgk1 (Santa Cruz Biotechnology) dilué 1:50000. Les anticorps secondaires couplés à l'HRP étaient: anti-chèvre (Santa Cruz Biotechnology) pour Rad53 et Clb5 dilué 1:10 000 et anti-souris (Cell Signaling) diluée 1:10 000 pour Pgk1. Après avoir lavé les membranes dans la solution de blocage et ensuite dans du PBST (1X PBS pH7,4 et 0,01% Tween), les protéines ont été visualisées par chimiluminescence (Clarity<sup>TM</sup> Western ECL substrate, BioRad) sur un film d'autoradiographie de haut niveau de sensibilité (Denville Scientific).



## 2.7 CYTOMÉTRIE EN FLUX

Les échantillons fixés dans l'éthanol 70% froid à 4°C ont été centrifugés à 13000rpm pendant 1min à 4°C et le surnageant a été jeté. Le culot cellulaire a été lavé dans 1mL 50mM NaCitrates pH7 et les cellules ont été resuspendues dans 500µL 50mM Na Citrate pH7 contenant 0,4mg/mL RNaseA (10mg/mL) et incubées durant la nuit à 37°C. Les cellules ont été culotées suite à une centrifugation à 13000rpm pendant 5min à température pièce et resuspendues dans 200µL 50mM Na Citrate pH7 contenant 0,5mg/mL Protéinase K (20mg/mL) à 50°C pendant 30min. Le tube a été centrifugé à 13000rpm pendant 5min à température pièce et le culot cellulaire a été resuspendu dans 300µL 50mM Na Citrate pH7. À ces échantillons, 200µL d'une solution de 50mM Na Citrate pH7 avec 50nM sytox green (50µM) a été ajoutée. Les échantillons ont été incubés à température pièce et protégés de la lumière pour au moins 2 heures. Ensuite, les cellules colorées ont été soniquées par le sonicateur QSonica Q700 (QSonica LLC, CT USA) avant d'être analysées par un cytomètre FACSCalibur (BD Biosciences,) à l'aide du logiciel Cell Quest Pro.

## CHAPITRE 3

### RÉSULTATS

#### **3.1 La délétion des cyclines précoces de la phase S ne rétabli pas la croissance des cellules avec télomères déprotégés.**

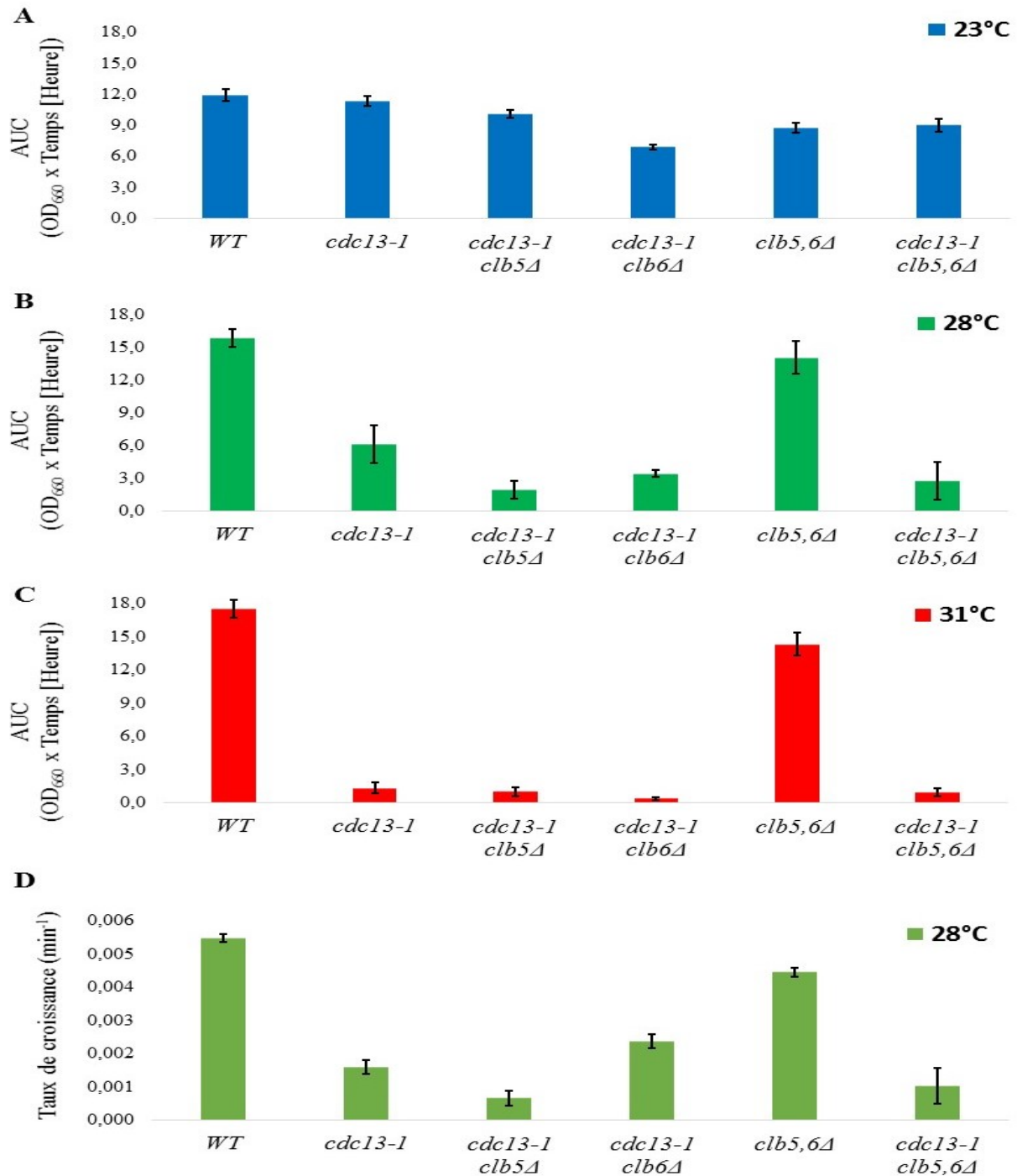
Dans le but d'identifier la ou les cyclines qui collaborent avec Cdc28 dans la résection extensive aux télomères, j'ai utilisé la souche *cdc13-1*, un modèle bien établi qui permet d'étudier la déprotection des télomères (Vodenicharov et Wellinger, 2007 ; Lydall, 2009 ; Wellinger, 2010). Les cellules étudiées dans ce projet avaient l'allèle *cdc13-1* ou le gène de type sauvage *CDC13* combiné avec différentes délétions de cyclines. La croissance à différentes températures était vérifiée afin de déterminer l'effet de ces délétions sur la thermosensibilité des cellules *cdc13-1*. Les travaux antérieurs ont suggéré que la kinase Cdc28 collabore avec les cyclines de type B dans la dégradation des télomères (Vodenicharov et Wellinger, 2006). Ainsi, nous avons analysé l'effet de délétion de ces six cyclines. Ces mutants ont été regroupés dans trois différents groupes: les mutants ayant des délétions de cyclines précoces de la phase S, les mutants ayant des délétions de toutes les cyclines de la phase S et les mutants ayant des délétions de cyclines de la phase M. L'incubation des souches à des températures élevées a permis d'induire la déprotection des télomères dans les mutants qui ont l'allèle thermosensible *cdc13-1*. Puisque la déprotection des télomères dans les cellules *cdc13-1* exposées à une température élevée active le point de contrôle du cycle cellulaire G2/M et l'arrêt de la division cellulaire (Garvik *et al.*, 1995), j'ai premièrement testé à des températures intermédiaires (températures semi-permissives) pour la croissance des cellules, afin de déterminer la température optimale à utiliser dans notre fond génétique. Ces tests préliminaires ont établi que la température de 28°C est la température semi-permissive appropriée pour l'observation de la croissance des cellules *cdc13-1* et l'effet de délétion des différents groupes de cyclines.

### 3.1.1 Analyses quantitatives de la croissance

La manière classique d'évaluer la croissance d'une souche particulière est par le calcul des paramètres de croissance, comme le temps lag et la vitesse  $\mu_{\max}$ , à partir de la pente d'une courbe de croissance. Cependant, dans notre cas, il s'est avéré que la forme des courbes était très hétérogène. En effet, selon le génotype analysé et les différentes températures testées, l'application d'une telle approche était impossible. Bien entendu, nous ne sommes pas les seuls à avoir obtenu des formes de courbe de croissance qui ne se prêtent pas facilement à une analyse des paramètres de croissance. Pour contourner ce problème, nous avons utilisé une approche non paramétrique qui repose sur le calcul du logarithme de l'aire totale sous la courbe (AUC) pour représenter l'aptitude de croissance des cellules (McLellan *et al.*, 2012). Ainsi, suite au calcul de l'aire totale sous la courbe qui est réalisable par Excel (voir la section Matériels et Méthodes pour détails), une valeur plus élevée du logarithme de l'AUC correspondrait à une plus grande aptitude de croissance pour une souche donnée. L'AUC d'une souche donnée a été aussi normalisé en le soustrayant avec celui du puits contrôle contenant seulement du milieu. Afin de simplifier l'information présentée dans les figures et d'éviter d'obtenir des valeurs négatives à cause du logarithme d'une valeur plus petit que un, les résultats sont présentés directement par la valeur AUC. En parallèle, nous avons utilisé également un logiciel conçu pour calculer certains paramètres de croissance (par exemple, le temps lag, le taux de croissance et le temps de duplication de cellules) justement pour les cas où les courbes de croissance présentent une forme hétérogène (Hall *et al.*, 2013). Ce logiciel, nommé GrowthRates, a permis également de comparer avec les résultats obtenus à l'aide de la méthode AUC. Ainsi, les résultats d'analyse quantitative de la croissance en calculant le taux de croissance ou bien l'AUC pour les courbes de croissance obtenue à partir d'une culture en phase exponentielle ou d'une culture renouvelée dense sont présentés ici-bas.

Les figures 3.1A, B et C représentent la moyenne et l'écart-type de l'AUC des souches indiquées portant des délétions de cyclines précoces de la phase S à partir d'une culture renouvelée dense. Après avoir dilué la culture initiale à  $0,02 \times 10^5$  cellules par millilitre, les microcultures ont été poussées dans des microplaques à 96 puits pendant une durée de 36 heures à trois différentes températures : permissive (23°C ; figure 3.1A), semi-permissive (28°C ; figure 3.1B) et restrictive (31°C ; figure 3.1C) pour l'allèle *cdc13-1*. L'analyse sur la croissance des différents génotypes identifiés dans la figure 3.1 a été faite, pour la majorité, avec plus d'un clone et chaque souche a été déposée en triplicata sur la microplaque à 96 puits.

En général, l'analyse de la croissance à partir d'une culture saturée est appliquée lorsqu'on analyse un grand nombre de souches dans une même expérience. L'inconvénient de cette méthode est que les résultats obtenus peuvent être biaisés par la présence de cellules mortes ou à une viabilité réduite dans la culture initiale parce que ces cellules sont comptées pendant la dilution et l'inoculation des microcultures. Ainsi, si présentes dès le départ dans la microculture, les cellules ayant une aptitude de croissance diminuée peuvent avoir un impact négatif sur la croissance, tel que les paramètres de la courbe finale ne reflètent pas uniquement l'effet des mutations d'intérêt. Bien entendu, lorsqu'on supprime l'expression de gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire, ce problème des biais lors l'analyse sur la croissance à partir d'une culture dense pourrait s'approfondir, puisque les cellules auront beaucoup de difficulté à repartir la division. Cet effet négatif est éliminé lorsqu'on travaille avec des cultures en phase exponentielle. L'analyse des cultures en phase exponentielle présente aussi ses propres inconvénients, comme manipuler simultanément une série de cultures avec plusieurs génotypes possédants différents temps de duplication en culture liquide et qui doivent tous avoir une valeur de densité optique assez proche. Ainsi, lorsque nécessaires et pour un nombre de souches limitées, des expériences à partir de cultures en phase exponentielle ont été également réalisées à une température semi-permissive de 28°C.



**Figure 3.1 Effet de délétion des cyclines de la phase S précoce sur la croissance.** Les souches de levures WT (YE46 et YE48), *cdc13-1* (YE742, YE1613, YE1615), *cdc13-1 clb5Δ* (YE2724 et YE2850), *cdc13-1 clb6Δ* (MVY672), *clb5,6Δ* (YE733, YE3368 et YE3369) et *cdc13-1 clb5,6Δ* (YE2739, YE2740 et YE2741) ont été renouvelées dans un milieu riche YEPD jusqu'à saturation. À la suite d'une dilution, les cellules ont été incubées à une température permissive de 23°C (A), une semi-permissive de 28°C (B) ou une température restrictive de 31°C (C) pendant 36 heures dans une microplaque et la lecture de la densité optique a été mesurée par un lecteur Biotek HT. L'effet sur la croissance des différentes délétions de cyclines en combinaison avec un allèle type sauvage ou thermosensible de Cdc13 a été calculé par l'aire sous la courbe (AUC; OD<sub>660</sub> x Temps [Heure]) dans Excel. (D) À partir d'une culture en phase exponentielle, les dilutions des cellules avec les génotypes WT (YE46 et YE48), *cdc13-1* (YE1613 et YE1615), *cdc13-1 clb5Δ* (YE2724), *cdc13-1 clb6Δ* (MVY672), *clb5,6Δ* (YE733) et *cdc13-1 clb5,6Δ* (YE2741) ont été incubées à 28°C et l'analyse sur la croissance a été calculé par le taux de croissance (min<sup>-1</sup>).

Pour la souche contrôle, *cdc13-1*, l'exposition chronique à une température élevée (figure 3.1B et C) aboutit à une diminution de la viabilité des cellules en comparaison avec la souche de type sauvage, ce qui n'est le cas lorsque l'incubation est faite à température permissive (figure 3A). Ces résultats sont en accord avec les études publiées montrant que la croissance diminuée des cellules ayant l'allèle thermosensible de *cdc13-1* à une température élevée est due à l'accumulation d'ADN simple brin produit suite à la déprotection des télomères (Hartwell et Weinert, 1993 ; Garvik *et al.*, 1995). Lorsque la cellule de levure perçoit ce dommage à l'ADN, un arrêt du cycle cellulaire est induit pour permettre l'activation des voies de réparation de l'ADN (Hartwell et Weinert, 1993 ; Garvik *et al.*, 1995). Ainsi, nous pouvons corréler la baisse de la croissance avec la présence de dommages à l'ADN. Si une ou plusieurs cyclines de types B collaborent avec Cdc28 pour générer de l'ADN sb aux télomères déprotégés, la délétion de ces cyclines spécifiques de la famille de cycline de type B devrait conduire à une restauration de la croissance des cellules *cdc13-1* incubées à une température élevée. Étant donné que la délétion de cyclines peut aussi affecter la croissance, cette restauration devrait ramener la croissance des cellules *cdc13-1* à un niveau comparable à celle de la souche contrôle *CDC13* ayant des délétions des mêmes gènes de cyclines. Les expériences faites à partir de cultures denses montrent que la simple délétion de cyclines de la phase S précoce *clb5Δ* ou *clb6Δ* dans un background *cdc13-1* ne permet pas de restaurer la croissance (figure 3.1A, B et C). Ainsi, la suppression de ses cyclines ne permet pas de renverser l'effet de l'allèle *cdc13-1* sur la croissance puisque l'AUC diminue lorsque ses cellules sont exposées à des températures élevées (figure 3.1B et C). Au contraire, nous avons observé que la délétion de *CLB5* ou *CLB6* diminue le taux de croissance des cellules *cdc13-1* à une température semi-permissive de 28°C. Le même profil de croissance a été observé avec le double mutant *cdc13-1 clb5,6Δ*, et ce, compte tenu du fait que son contrôle *clb5,6Δ* est en mesure de maintenir la croissance aux mêmes températures élevées (figure 3.1A, B et C). Pour vérifier si la légère diminution de l'aptitude de croissance des cellules *cdc13-1* suite aux délétions des gènes *CLB5* et/ou *CLB6* est due à l'utilisation de cultures saturées, j'ai également vérifié la croissance de ces mêmes génotypes à partir d'une culture en phase exponentielle exposée à une température semi-permissive de 28°C (figure 3.1D). Les résultats nous permettent d'exclure la possibilité que la culture saturée ait eu

un impact négatif sur la croissance puisque la croissance est également diminuée dans les expériences réalisées à partir d'une culture exponentielle (figure 3.1D). Les cyclines précoces de la phase S, Clb5 et Clb6, sont connues pour son rôle dans l'initiation de la réplication (Epstein et Cross, 1992 ; Kuhl et Linder, 1993 ; Schwob et Nasmyth, 1993). Pourtant, la réduction de la croissance causée par la délétion d'une de ces deux cyclines semble plus prononcée dans une souche *cdc13-1* que dans la souche contenant l'allèle sauvage *CDC13* exposée à température semi-permissive (figure 3.1B et 3.1D). Une explication possible de ces observations est l'effet nuisible sur la réplication d'ADN de la perte combinée des cyclines Clb5/6 et la fonction de la protéine Cdc13 (voir section Discussion pour plus de détails).

### **3.1.2 La délétion des gènes *CLB5* et *CLB6* ne supprime pas la résection aux télomères déprotégés**

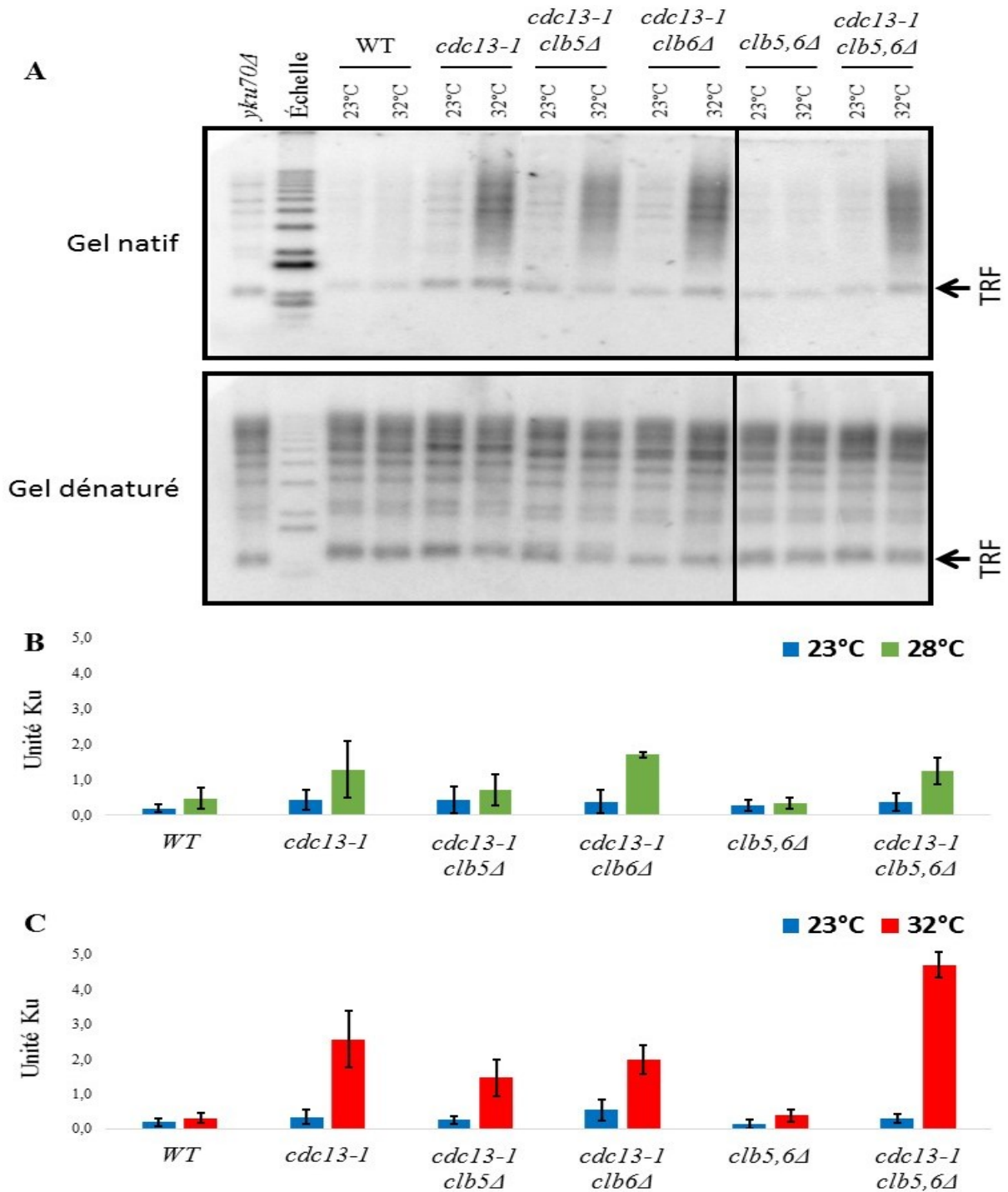
Nos observations que la délétion des cyclines précoces de la phase S ne reverse pas le défaut de croissance des cellules *cdc13-1* à température élevée, suggère que la fonction de Cdc28 dans la dégradation des télomères déprotégés n'est pas affectée par le manque de ces deux cyclines. Comme mentionné ci-haut, le défaut de croissance des cellules *cdc13-1* est dû à l'activation de la DDR par les dommages d'ADN aux télomères. Afin de confirmer que la résection des télomères et l'activation de la DDR ne sont pas affectées par l'absence des cyclines Clb5 et Clb6, des approches biochimiques et moléculaires ont été employées. La technique d'hybridation sous conditions natives (c'est-à-dire sans dénaturation d'ADN) dans un gel d'agarose semi-séché est une technique simple et relativement rapide qui permet d'analyser un grand nombre d'échantillons pour la présence de l'ADN sb télomérique à l'aide de sondes radiomarquées spécifiques (Dionne et Wellinger, 1996). Cette technique qui a été initialement utilisée pour visualiser l'ADN sb aux télomères, aujourd'hui, à l'aide de logiciels comme ImageQuant, permet de quantifier les signaux après l'hybridation.

Bien que cette technique soit très utilisée dans le cadre des études sur la résection aux télomères, elle présente plusieurs désavantages. Cette technique utilise une sonde radiomarquée qui lie spécifiquement les répétitions télomériques G/C-riche. Ces répétitions mesurent environ 300-350 pb dans une souche de type sauvage et l'analyse quantitative de ses séquences est effectuée suite à la digestion de l'ADN génomique par l'enzyme de restriction XhoI, ce qui permet la libération du fragment terminal des chromosomes, TRF. Un premier problème vient du fait que si la dégradation du brin C-riche télomérique dépasse ces 350 bp des répétitions télomériques, l'ADN sb accumulé dans les séquences sous-télomériques ne serait pas quantifiable puisque la sonde ne se lie pas à ces séquences. Une seconde faiblesse vient du fait que si la résection dépasse le site XhoI dans les régions sous-télomériques, le TRF n'est pas libéré parce que l'enzyme de restriction digère uniquement de l'ADN double brin. Ceci peut conduire à des résultats qui nous feront croire que la résection n'a pas eu lieu, ce qui est faux. Lors de la quantification des signaux, j'évite ce problème en quantifiant le signal dans la piste au complet, au lieu du TRF seul. Ainsi, ces limitations ont été prises en considération lors de l'interprétation des résultats obtenus par cette approche expérimentale.

La figure 3.2 représente la quantification de l'ADN sb, exprimé en unité Ku (voir les Matériels et Méthodes), dans les mutants ayant des délétions de cyclines précoces de la phase S en croissance exponentielle et exposés pendant deux heures et demie aux températures indiquées. Afin de s'assurer que la sonde était bien distribuée dans le sachet de plastique, deux échantillons d'ADN extrait d'une souche *yku70Δ* ont été déposés des deux côtés de chaque gel. Les souches portant la délétion d'une des sous-unités du complexe Yku (*yku70Δ* ou *yku80Δ*) sont souvent utilisées comme contrôle d'hybridation puisque la délétion entraîne une déprotection des télomères avec une extension 3' simple brin qui est plus long que la taille normale des télomères tout au long du cycle cellulaire (Gravel *et al.*, 1998; Polotnianka *et al.*, 1998).



Un exemple d'un gel natif qui a été utilisé pour quantifier l'ADN simple brin est représenté dans la figure 3.2A (gel du haut). Les valeurs pour les signaux obtenues à partir du gel natif sont normalisées à l'aide de la quantité d'ADN total déposée dans les puits suite à la dénaturation du gel (Fig. 3.2A, gel du bas). Finalement, les valeurs normalisées ont été exprimées en unité Ku en comparant avec la valeur normalisée de l'échantillon *yku70Δ*. Comme attendu, le signal provenant des télomères des souches type sauvage (WT) est moindre que le signal pour les cellules *yku70Δ* où la résection est accrue. Par contre, la résection est beaucoup plus importante dans les cellules *cdc13-1* exposées à une température non-permissive de 32°C (figure 3.2A). L'exposition des cellules *cdc13-1* à une température semi-permissive de 28°C montre que la résection est en moyenne plus élevée par rapport au contrôle à 23°C (figure 3.2B). Cependant, cette résection est apparemment limitée puisqu'elle n'inhibe pas complètement la croissance des cellules à température semi-permissive (figure 3.1B et D). Notamment, les souches *cdc13-1* contenant des délétions de cyclines précoces de la phase S ne manifestent pas une résection plus élevée que la souche contrôle *cdc13-1* (figure 3.2B), malgré que leur croissance soit réduite par rapport au contrôle (figure 3.1B et D). Ainsi, la délétion des gènes *CLB5* et *CLB6* a un effet négatif supplémentaire sur la croissance des cellules *cdc13-1* qui n'est pas nécessairement lié à l'accumulation plus importante d'ADN sb aux télomères. Ensemble, les analyses quantitatives de la résection dans les mutants de cyclines précoces de la phase S à température semi-permissive (figure 3.2B) et restrictive (figure 3.2C) pour l'allèle *cdc13-1* montrent que la résection n'a pas été supprimée par la délétion de ces cyclines, ainsi, signifiant que l'activité de Cdc28 dans la résection des télomères déprotégés ne nécessite pas ces cyclines.

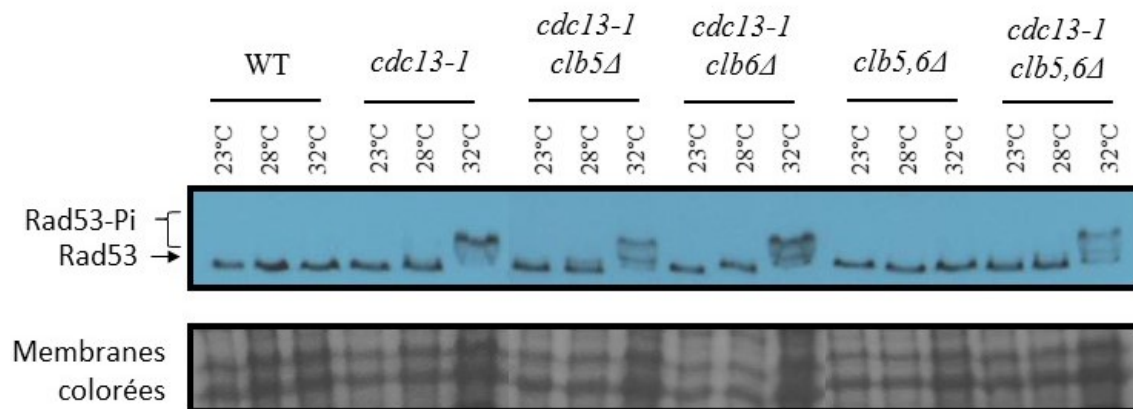


**Figure 3.2 Quantification de l'ADN simple brin dans les mutants de cyclines précoces de la phase S.** (A) L'ADN génomique des souches de levures indiquées a été analysé par la technique d'hybridation native dans le gel pour visualiser la dégradation des télomères. Un exemple de gels natifs non contigus hybridés par une sonde spécifique aux répétitions télomériques pour détecter l'ADN télomérique simple brin est présenté dans le panel du haut. Les mêmes gels ont été dénaturés et rehybridés pour détecter, cette fois-ci, l'ADN total. Des cultures asynchrones des souches de levures WT (YE46 et YE48), *cdc13-1* (YE1613, YE1615), *cdc13-1 clb5Δ* (YE2724 et YE2850), *cdc13-1 clb6Δ* (YE3623 et MVY672), *clb5,6Δ* (YE733 et YE3368) et *cdc13-1 clb5,6Δ* (YE2739 et YE2741) ont été incubées pour une durée de 2 heures à une température semi-permissive de 28°C (B) et restrictive de 32°C (C). Suite à l'hybridation avec une sonde télomérique, l'ADN simple brin produit par la dégradation a été quantifié par ImageQuant et les résultats normalisés ont été exprimés en unité Ku. Les résultats proviennent de trois expériences indépendantes (N = 3).

### **3.1.3 L'activation de la réponse aux dommages à l'ADN suite à la déprotection des télomères n'est pas affectée dans les mutants *clb5Δ clb6Δ***

Les télomères déprotégés d'une souche *cdc13-1* exposée à une température élevée déclenchent la voie de la DDR, qui entrainera un arrêt du cycle cellulaire en G2/M d'une manière Rad9-dépendant (Hartwell et Weinert, 1993 ; Garvik *et al.*, 1995). L'activation de cette réponse et l'arrêt de la division sont une conséquence de l'accumulation d'ADN sb en complexe avec la protéine RPA (Zou et Elledge, 2003). Les observations sur la résection dans les souches mutantes de cyclines précoces de la phase S suggèrent que le taux réduit de croissance de ces souches soit un résultat de l'activation de la DDR.

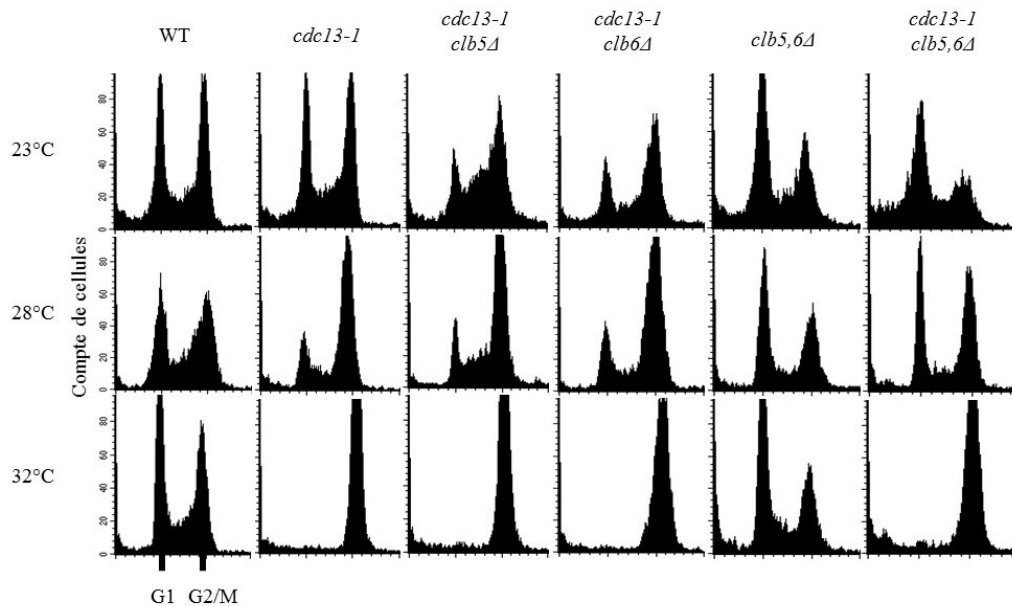
Lorsque la DDR est activée chez la levure bourgeonnante, la protéine kinase effectrice Rad53 est fortement phosphorylée, ce qui est visible par l'apparition de bandes retardées correspondant aux formes phosphorylées de la protéine sur un gel d'acrylamide. L'évaluation de l'activation de la DDR en observant les formes phosphorylées de Rad53 par immunobuvardage de type western est présentée à la figure 3.3. On constate que les souches *cdc13-1* ayant une simple ou une double délétion de cyclines précoces de la phase S activent la DDR pleinement suite à l'exposition à une température non-permissive, comme jugé par l'ampleur comparable de phosphorylation de la protéine Rad53 à celle de la souche contrôle *cdc13-1*. L'exposition à une température semi-permissive conduit à l'apparence de très peu de formes phosphorylées, le cas échéant, en corrélation avec la capacité (même si diminué) de cellules de croître à cette température (figure 3.1B).



**Figure 3.3 La phosphorylation de la protéine Rad53 dans la souche *cdc13-1* n'est pas empêchée par la deletion des *CLB5* et *CLB6*.** Les échantillons protéiques des souches de levures WT (YE48), *cdc13-1* (YE1613), *cdc13-1 clb5Δ* (YE2724), *cdc13-1 clb6Δ* (YE3623), *clb5,6Δ* (YE733) et *cdc13-1 clb5,6Δ* (YE2741) ont été analysés par immunobuvardage de type western en utilisant des anticorps contre Rad53. L'apparition des bandes retardées correspondant aux formes phosphorylées de Rad53 (Rad53-Pi) indique l'activation de la DDR. La membrane rouge Ponceau teinté (panneau inférieur) sert de contrôle de chargement.

Une autre conséquence de l'activation de la DDR est l'arrêt du cycle cellulaire et l'accumulation de cellules en G2/M. La distribution des cellules dans le cycle cellulaire a été évaluée par cytométrie en flux et les profils montrent qu'à une température non-permissive de 32°C toutes les souches possédant l'allèle *cdc13-1* ont été arrêtées en G2/M (figure 3.4).

L'ensemble de ces résultats suggère que les cyclines précoces de la phase S ne collaborent pas avec Cdc28 dans la résection des télomères déprotégés.



**Figure 3.4 Évaluation de l'arrêt en G2/M dans les cellules mutantes des cyclines précoces de la phase S.** La distribution des cellules WT (YE46), *cdc13-1* (YE1613), *cdc13-1 clb5Δ* (YE2724), *cdc13-1 clb6Δ* (YE3623), *clb5,6Δ* (YE733) et *cdc13-1 clb5,6Δ* (YE2741) dans le cycle cellulaire a été déterminée par cytométrie en flux. Le premier pic correspond aux cellules en phase G1 et le deuxième aux cellules en G2/M.

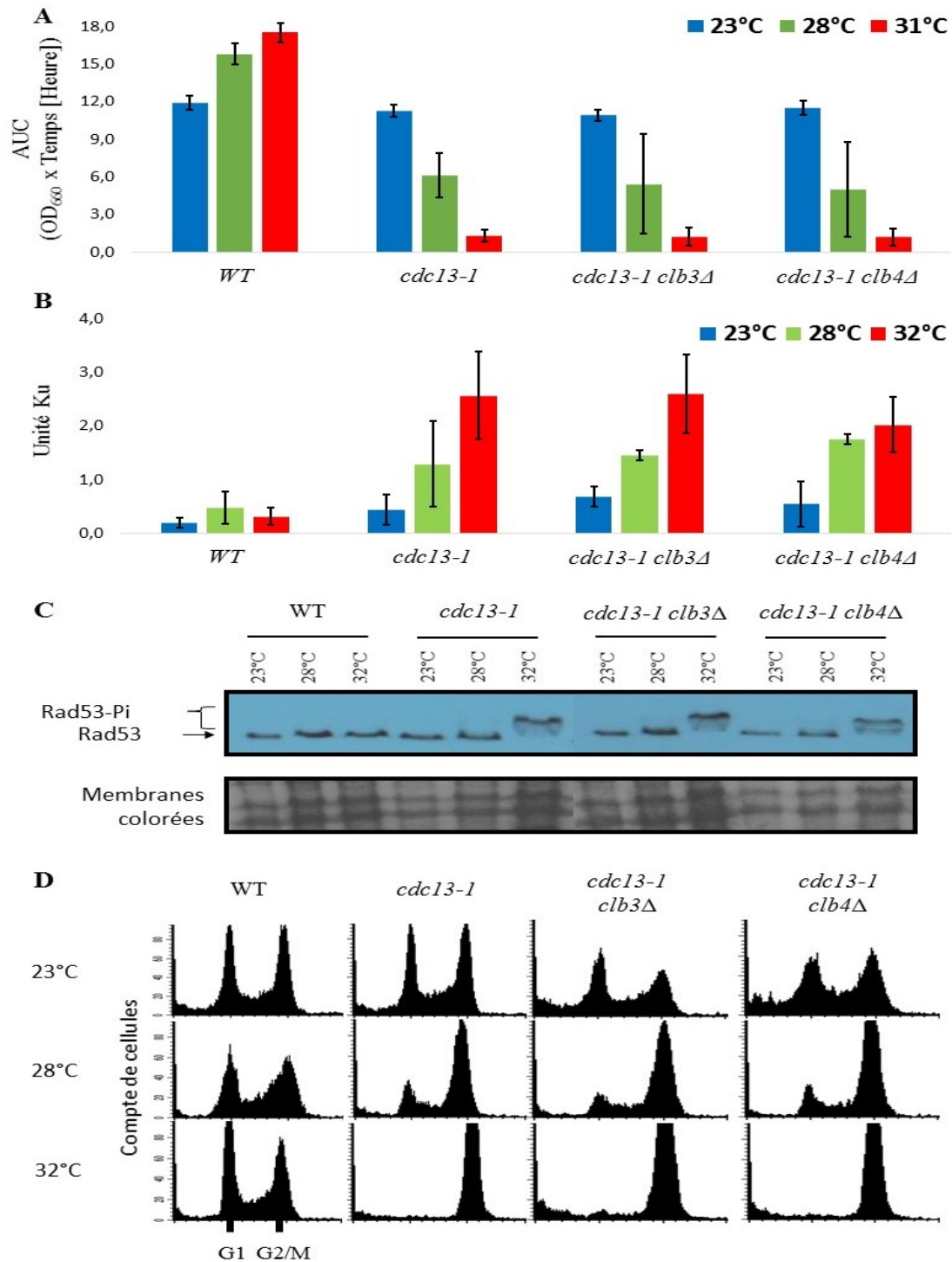
### 3.2 Les cyclines de la phase S ne sont pas impliquées dans la résection aux télomères déprotégés médiée par Cdc28

Afin de déterminer si d'autres cyclines de la phase S assistent à la fonction de la kinase Cdc28 dans la résection des télomères dans la souche *cdc13-1*, l'analyse du deuxième groupe de mutants, représentant de l'ensemble des cyclines de la phase S, a été abordé. Cette analyse est débuté par la caractérisation de différentes combinaisons de doubles et triples délétions des cyclines pour terminer avec la quadruple délétion de toutes les cyclines de la phase S, Clb3, Clb4, Clb5 et Clb6. La paire de cyclines Clb3/4 semble jouer un rôle complémentaire aux cyclines précoces Clb5/6 dans la progression de la réplication d'ADN, ainsi que promouvoir la

transition S-G<sub>2</sub> du cycle cellulaire (Fitch *et al.*, 1992 ; Richardson *et al.*, 1992 ; Schwob et Nasmyth, 1993). Puisque les simples et doubles délétions de Clb5 et Clb6 ont été déjà abordées, nous avons complété l'analyse avec l'évaluation des effets de simple délétion des gènes *CLB3* et *CLB4* sur la croissance, la résection et l'activation de la DDR suite à l'exposition des cellules *cdc13-1* à une température élevée.

Tel que la figure 3.5A le montre, l'analyse quantitative de la croissance par la méthode de l'AUC des mutants *cdc13-1 clb3Δ* et *cdc13-1 clb4Δ* présentent une diminution dans la croissance similaire au contrôle à des températures élevées. La faculté de croissance est progressivement affaiblie lors de l'incubation aux températures croissantes de 28°C et de 32°C (3.5A) et est accompagnée d'une accumulation plus importante d'ADN simple brin aux télomères (figure 3.5B). De plus, l'activation de la DDR, démontrée par la présence de formes phosphorylées de la protéine Rad53 (Rad53-Pi) (figure 3.5C), et l'arrêt du cycle cellulaire en G2/M (figure 3.5D) observé chez les cellules *cdc13-1* restent inchangés en absence des cyclines Clb3 ou Clb4. Ces résultats permettent à conclure que les cyclines Clb3 et Clb4 seules ne jouent aucun rôle au niveau de la résection des télomères déprotégés puisque leur délétion n'a pas d'effet sur les phénotypes caractéristiques de la souche contrôle *cdc13-1*.

Ainsi, les prochaines analyses ont porté sur la vérification de différentes combinaisons des cyclines de type B participant à la progression de la phase S.

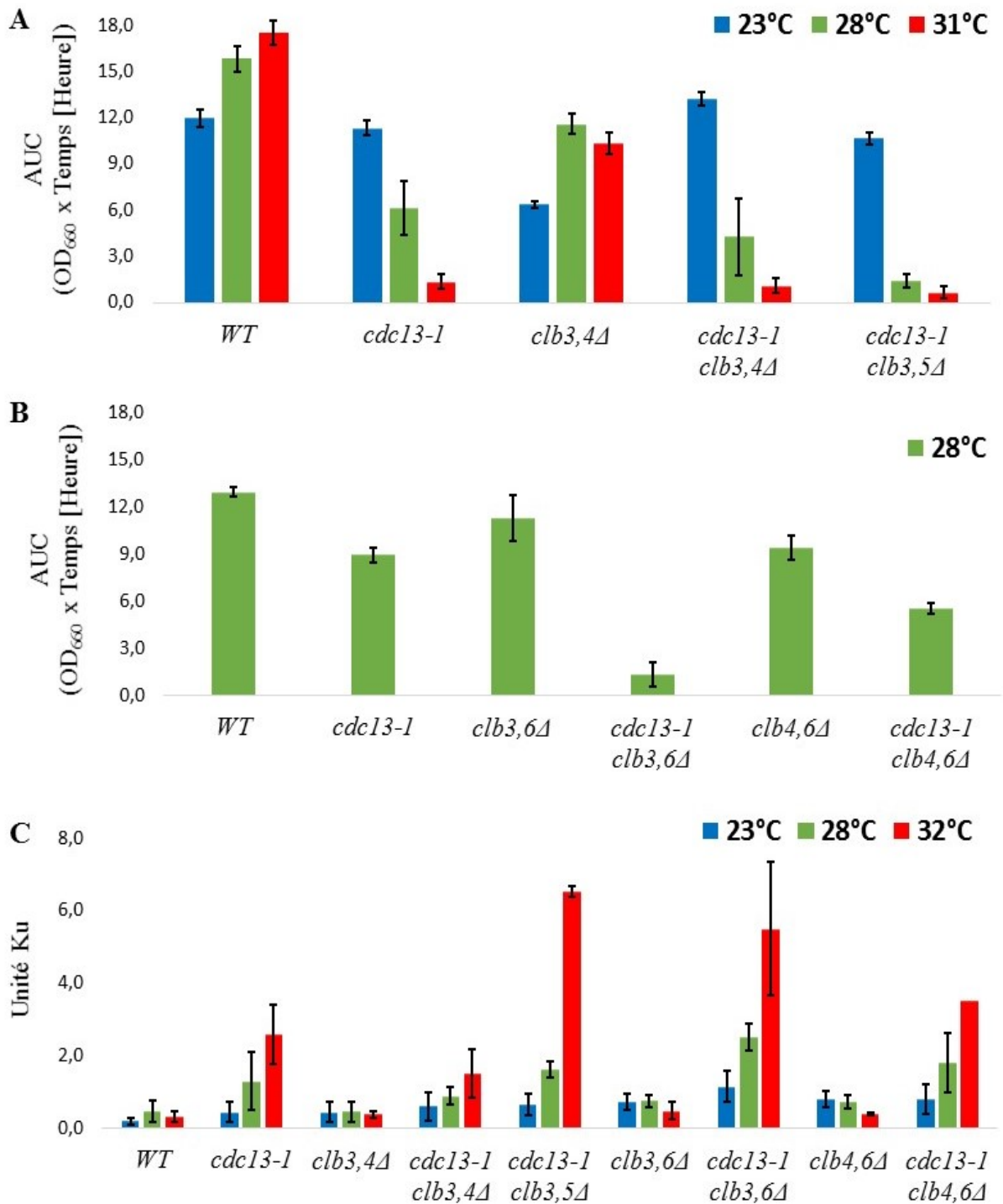


**Figure 3.5** Effet de la délétion de cyclines Clb3 et Clb4 sur la croissance (A), sur le niveau de simple brin (B) et sur l'activation de la DDR (C, D) dans les cellules *cdc13-1*. (A) Les souches de levures WT (YE46 et YE48), *cdc13-1* (YE1613 et YE1615), *cdc13-1 clb3Δ* (YE1663) et *cdc13-1 clb4Δ* (YE1803) ont été poussées à températures indiquées et la croissance analysée comme dans la figure 3.1. (B) L'ADN ss aux télomères des souches identifiées ci-haut a été quantifié par la technique d'hybridation non dénaturante de même manière que celle-ci décrite dans la figure 3.3. (C) Des échantillons protéiques des souches de levures WT (YE48), *cdc13-1* (YE1613), *cdc13-1 clb3Δ* (YE1663) et *cdc13-1 clb4Δ* (YE1803) ont été analysés par immunobuvardage de type western pour visualiser la phosphorylation de Rad53, comme à la figure 3.3. (D) La distribution des cellules WT (YE46), *cdc13-1* (YE1613), *cdc13-1 clb3Δ* (YE1663) et *cdc13-1 clb4Δ* (YE1803) dans le cycle cellulaire a été évaluée en mesurant le contenu d'ADN par cytométrie de flux.

### 3.2.1 Les délétions combinées de deux ou trois cyclines de la phase S ne supprime pas la résection et la thermosensibilité des cellules *cdc13-1*

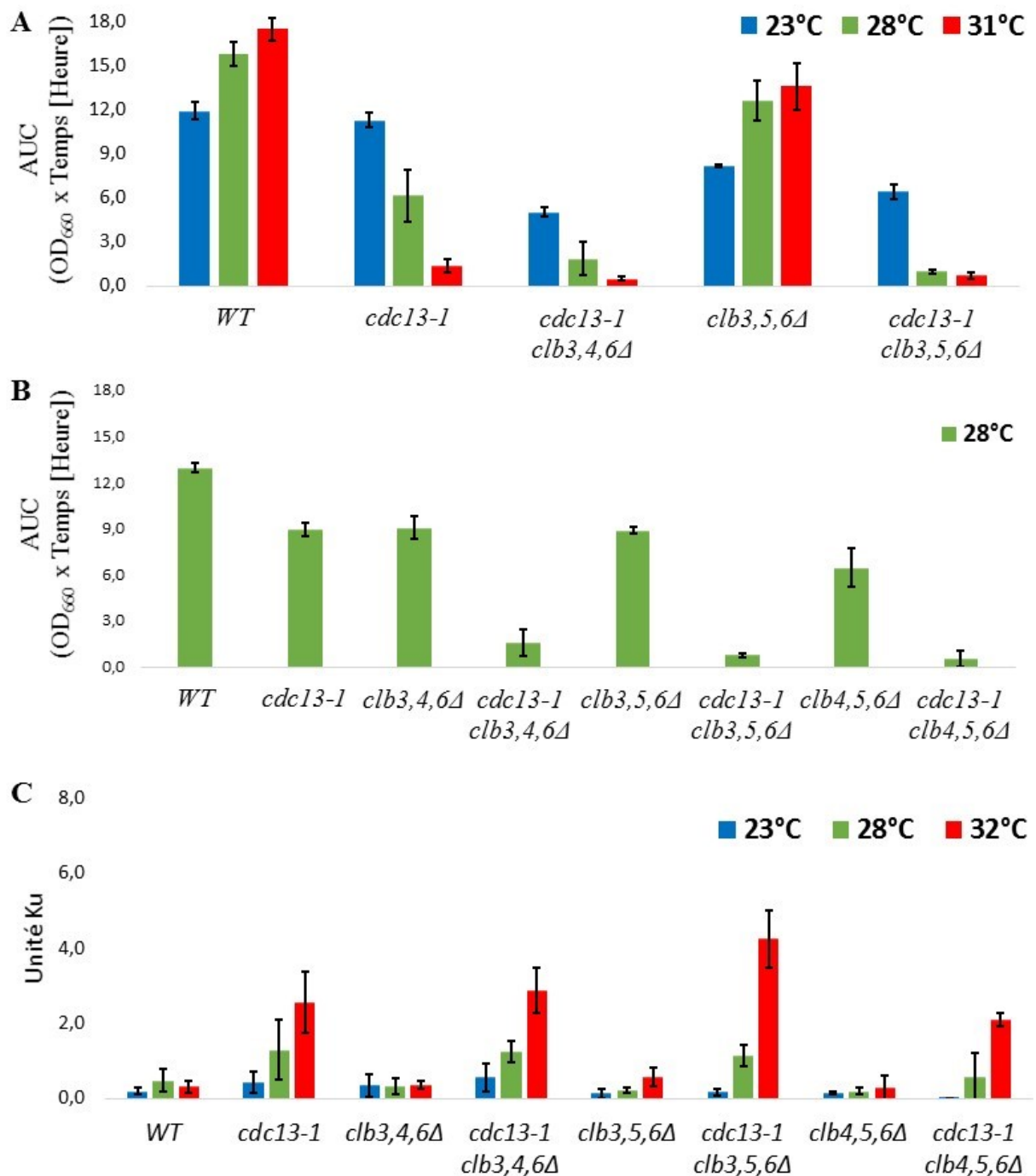
Toutes les combinaisons de délétions des cyclines de la phase S sont en principe viables, sauf le triple mutant *clb3Δ clb4Δ clb5Δ* qui a été déclaré non viable dans certains fonds génétiques (Schwob et Nasmyth, 1993). Toutefois, les souches utilisées dans notre étude sont isogéniques du fond génétique BF264-15D où la souche *clb3,4,5Δ* est viable (Epstein et Cross, 1992). La figure 3.6 montre quelques exemples de souches portant des doubles délétions de cyclines de la phase S et leur effet sur la croissance des mutants *cdc13-1* et la résection. Essentiellement, aucune combinaison de deux délétions n'était en mesure de renverser le phénotype des cellules *cdc13-1* à ce qui est du type sauvage. Certaines des doubles délétions de cyclines de la phase S en combinaison avec *cdc13-1* ont diminuée la croissance à une température semi-permissive de 28°C de manière plus importante en comparaison aux contrôles (figure 3.6A et B). En particulier, les souches contenant les doubles délétions *clb3,5Δ* ou *clb3,6Δ* manifestent une thermosensibilité accrue à une température semi-permissive, ainsi que de quantités plus importantes de l'ADN sb lorsqu'incubées à une température non-permissive (figure 3.6C). En général, à une température de 32°C, tous les doubles mutants présentent une quantité d'ADN simple brin élevé (figure 3.6C), une inhibition complète de la croissance (figure 3.6A) et une activation de la DDR (données non montrées). Ces résultats signifient que la combinaison de double délétion de cyclines de la phase S ne permet pas de renverser l'effet de l'allèle thermosensible *cdc13-1* sur la croissance et la résection des télomères déprotégés à une température non-permissive.



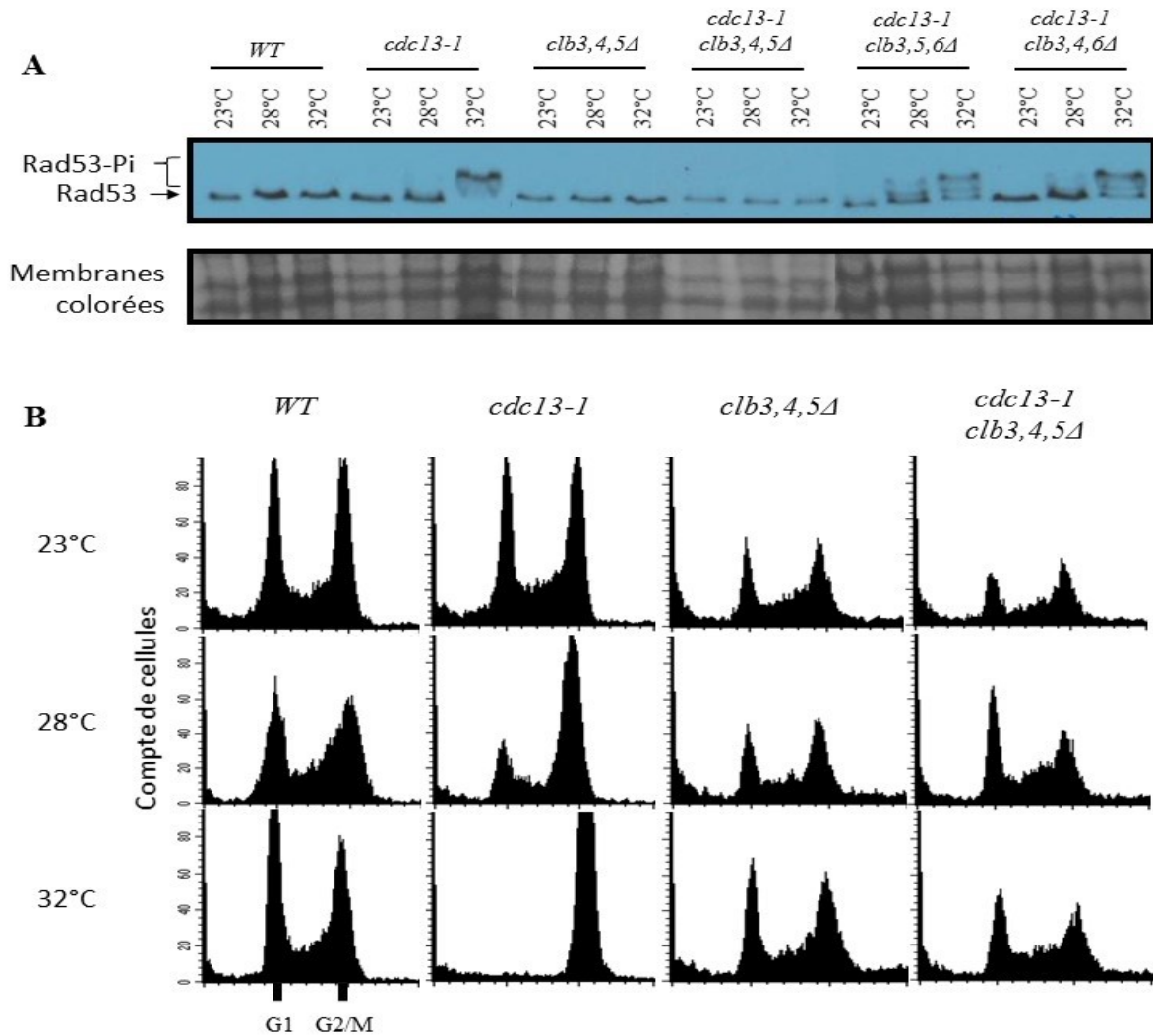


**Figure 3.6 Effet de doubles délétions de cyclines de la phase S sur la croissance et sur le niveau de simple brin des cellules *cdc13-1*.** (A) Les contrôles WT (YE46 et YE48), *cdc13-1* (YE1613 et YE1615) et *clb3,4Δ* (YE1807) et les souches *cdc13-1 clb3,4Δ* (YE1806 et YE2848) et *cdc13-1 clb3,5Δ* (YE2849) ont été analysées pour leur croissance à une température de 23°C, 28°C et 31°C et la croissance représentée par l'AUC comme dans la figure 3.1. (B) La croissance à une température de 28°C des contrôles WT (YE46), *cdc13-1* (YE1613), *clb3,6Δ* (MVY644 et MVY645), *clb4,6Δ* (MVY648 et MVY649) et les souches, *cdc13-1 clb3,6Δ* (MVY646 et MVY647) et *cdc13-1 clb4,6Δ* (MVY670 et MVY673) a été analysée de la même manière qu'en (A). (C) L'ADN sb aux télomères des souches identifiées a été quantifié par la technique d'hybridation non dénaturante. Des cultures asynchrones ont été exposées pour 2 heures à une température permissive (23°C), semi-permissive (28°C) ou non-permissive (32°C) et les valeurs ont été normalisées et exprimées en unité Ku.

Les analyses sur la croissance et sur la dégradation des télomères déprotégés dans des mutants portant une triple délétion des cyclines de la phase S ont révélé qu'en général l'impact négatif sur la croissance de ces délétions s'approfondit en combinant avec l'allèle *cdc13-1* (figure 3.7A et B). L'impact combiné de la mutation *cdc13-1* et les délétions de cyclines sur la croissance sont surtout évidents lorsque les cellules ont été incubées à une température semi-permissive. On estime que l'aptitude de croissance des souches triple-mutant à 28°C soit réduite 6 à 10 fois en comparaison avec la souche contenant la même combinaison de trois délétions de gènes de cyclines, mais ayant l'allèle sauvage de *CDC13* (figure 3.7B). Par contre, dans une souche contrôle *cdc13-1*, exposé à la même température, on observe une réduction de 30-40% de l'aptitude de croissance par rapport d'une souche de type sauvage. Curieusement, cette réduction sévère de la croissance à une température semi-permissive des cellules *cdc13-1* en présence des délétions de cyclines de la phase S n'est pas accompagnée avec une hausse marquante de l'ADN sb aux télomères (figure 3.7C). Sachant que la délétion de multiples cyclines affecterait négativement la réplication d'ADN durant la phase S, la croissance réduite de cellules peut être expliquée par le ralentissement des fourches de réplication et l'accumulation d'intermédiaires qui demandent l'activation des mécanismes de réparation d'ADN. Les télomères, étant des régions difficiles pour la réplication, deviennent probablement un obstacle encore plus important quand la fonction de la protéine Cdc13 est compromise partiellement à 28°C. Cette hypothèse est soutenue par l'analyse de l'activation de la protéine Rad53 qui semble plus fortement phosphorylée dans les souches *cdc13-1* avec triple délétion de cyclines que dans la souche contrôle *cdc13-1*, et ce, notamment, à température de 28°C, mais pas à 23°C (figure 3.8A). D'ailleurs, à une température non-permissive de 32°C, toutes les souches contenant l'allèle *cdc13-1* combiné avec différentes triples délétions de cyclines se comportent comme le contrôle, ainsi indiquant que la perte de viabilité due à la dégradation des télomères n'est pas supprimée par la délétion de ces cyclines (voir la figure 3.7A et C pour certains exemples de souches).

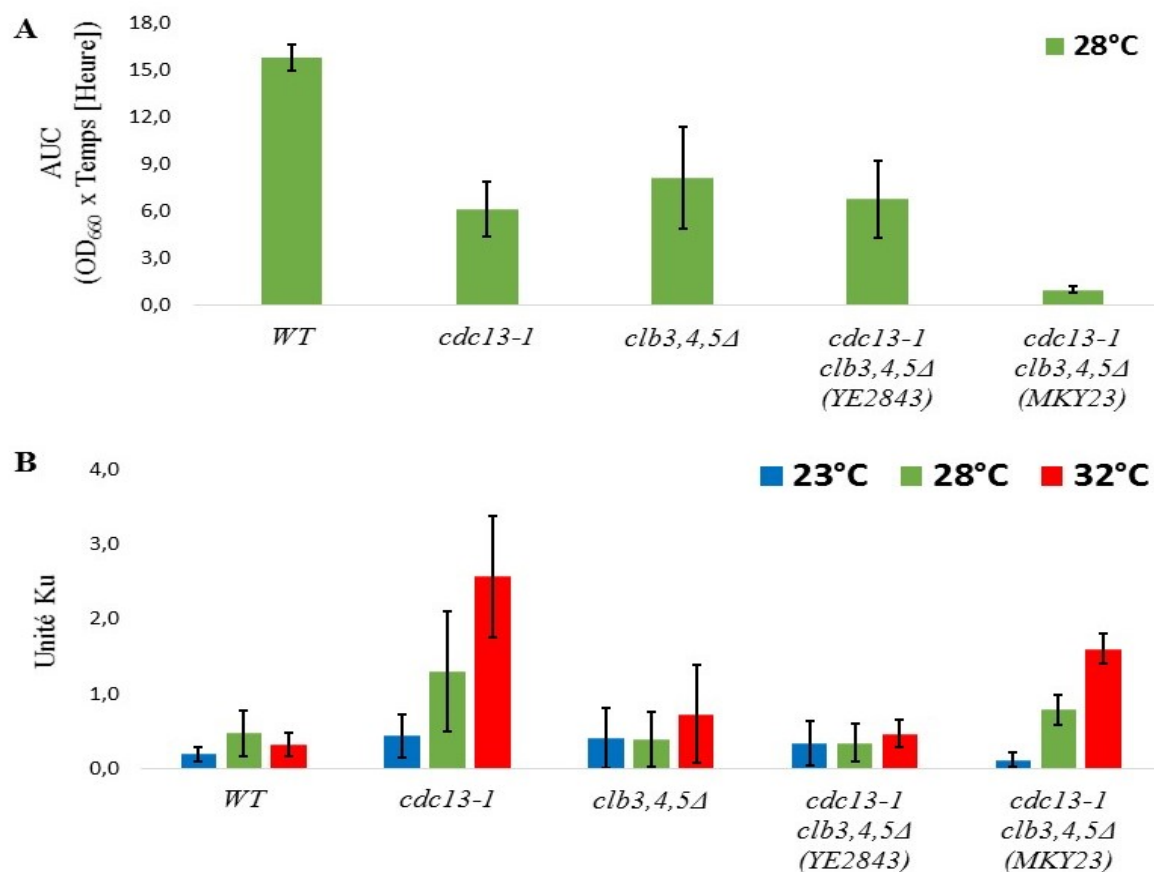


**Figure 3.7 Effet de triples délétions de cyclines de la phase S sur la croissance et sur le niveau de simple brin des cellules *cdc13-1*.** (A) Les contrôles WT (YE46 et YE48), *cdc13-1* (YE1613 et YE1615) et *clb3,4Δ* (YE1807) et les souches *cdc13-1 clb3,4,6Δ* (YE2804 et YE3664), *clb3,5,6Δ* (Y2847) et *cdc13-1 clb3,5,6Δ* (YE3625 et YE3668) ont été analysées pour leur croissance à une température de 23°C, 28°C et 31°C et la croissance représentée par l'AUC comme dans la figure 3.1. (B) La croissance à une température de 28°C des contrôles WT (YE46), *cdc13-1* (YE1613), *clb3,4,6Δ* (MKY24 et MVY674), *clb3,4,6Δ* (MKY24 et MVY674), *clb4,5,6Δ* (MVY677) et les souches, *cdc13-1 clb3,4,6Δ* (MVY675 et MVY676), *cdc13-1 clb3,5,6Δ* (MVY635), et *cdc13-1 clb4,5,6Δ* (MKY26) a été analysée de la même manière qu'en (A). (C) L'ADN ss aux télomères des souches identifiées a été quantifié par la technique d'hybridation non dénaturante. Des cultures asynchrones ont été exposées pour 2 heures à une température permissive (23°C), semi-permissive (28°C) ou non-permissive (32°C) et les valeurs ont été normalisées et exprimées en unité Ku.



**Figure 3.8 Activation de la réponse aux dommages à l'ADN suite à la déprotection des télomères dans les mutants contenant une triple délétion de cyclines.** (A) Des échantillons protéiques des souches de levures WT (YE48), *cdc13-1* (YE1613), *clb3,4,5Δ* (YE2846), *cdc13-1 clb3,4,5Δ* (YE2843), *cdc13-1 clb3,5,6Δ* (YE3625) et *cdc13-1 clb3,4,6Δ* (YE2804) ont été analysés pour la présence de bandes retardées correspondant aux formes phosphorylées de Rad53 de manière similaire à celle dans la figure 3.3. (B) La distribution des cellules WT (YE46), *cdc13-1* (YE1613), *clb3,4,5Δ* (YE2846) et *cdc13-1 clb3,4,5Δ* (YE2843) dans le cycle cellulaire a été analysée par cytométrie en flux. Le premier pic correspond aux cellules en phase G1 et le deuxième aux cellules en G2/M.

Lors de la caractérisation de cette série de souches, des résultats contradictoires ont été obtenus pour deux clones de la souche *cdc13-1 clb3,4,5Δ*, nommés respectivement YE2843 et MKY23. La figure 3.9 montre la comparaison entre ces deux clones individuels du génotype *cdc13-1 clb3,4,5Δ* et leur effet sur la croissance (figure 3.9A) et sur la résection (figure 3.9B). Nous observons qu'il existe de très grandes différences entre les résultats obtenus pour chacun des clones. La souche YE2843 est en mesure de renverser l'effet de l'allèle *cdc13-1*, puisque la croissance à des températures élevées est rétablie (figure 3.9A), ainsi que l'ADN simple brin est diminuée en comparaison avec le contrôle *cdc13-1* et semblable au contrôle *clb3,4,5Δ* (figure 3.9B). En absence de dommages aux télomères, aucune activation de la DDR n'est notée, contrairement au contrôle et d'autres souches portant des triples délétions de cyclines de la phase S, telles que *cdc13-1 clb3,4,6Δ* et *cdc13-1 clb3,5,6Δ* (figure 3.8A). En revanche, dans la souche MKY23 la croissance à 28°C est grandement diminuée (figure 3.9A) et l'accumulation du simple brin est augmentée à une température de 28°C et de 32°C (figure 3.9B). Alors, bien que les observations avec la souche YE2843 permettent de spéculer que l'action combinée des cyclines Clb3, Clb4 et Clb5 soit requise pour Cdc28 de réguler la résection aux télomères déprotégés, les résultats opposés provenant de l'autre clone ne nous permettent pas de confirmer que les résultats obtenus pour la souche YE2843 soient valables.



**Figure 3.9 Comparaison entre l'effet sur la croissance et le niveau d'ADN sb des deux clones *cdc13-1 clb3,4,5Δ*.** (A) La croissance à une température de 28°C des contrôles *WT* (YE46 et YE48), *cdc13-1* (YE1613 et YE1615), *clb3,4,5Δ* (YE2846) et des clones *cdc13-1 clb3,4,5Δ* (YE2843 et MKY23) ont été analysées pour leur croissance à une température de 28°C et la croissance représentée par l'AUC comme dans la figure 3.1. (B) L'ADN sb aux télomères des souches identifiées a été quantifié par la technique d'hybridation non dénaturante. Des cultures asynchrones ont été exposées pour 2 heures à une température permissive (23°C), semi-permissive (28°C) ou non-permissive (32°C) et les valeurs ont été normalisées et exprimées en unité Ku.

Pour tester si la triple délétion *clb3,4,5Δ* dans la souche YE2843 supprime également la thermosensibilité des cellules *cdc13-1* à des températures plus élevées, la croissance de cette souche a été analysée sur boîtes de gélose à une température de 36°C. Une souche contenant l'allèle *cdc13-1* ne devrait avoir aucune croissance à cette température. Sur un milieu de gélose

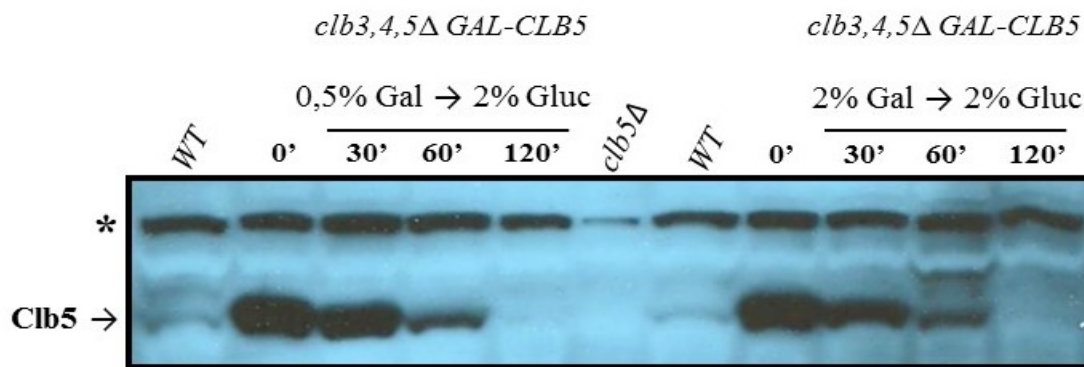
riche en nutriment (YEPD), j'ai strié et laissé incuber pendant au moins deux jours les contrôles WT (YE46 et YE48) et *cdc13-1* (YE1613 et YE1615) et les souches *clb3,4,5Δ* (YE2846) et *cdc13-1 clb3,4,5Δ* (YE2843). Tel qu'attendu les contrôles WT et *clb3,4,5Δ* ont eu une croissance sur le milieu, alors que les contrôles *cdc13-1* ne l'ont pas (données non montrées). La souche *cdc13-1 clb3,4,5Δ* (YE2843) avait également une croissance (données non montrées), ce qui est plutôt surprenant, puisqu'une suppression complète de la thermosensibilité implique que des nombreuses activités intervenantes à la résection doivent être inactivées (Ngo et Lydall, 2010 ; Dewar et Lydall, 2010). Une possibilité est qu'une mutation secondaire soit présente dans le gène *cdc13-1*, qui supprime l'effet de la mutation thermosensible et confère aux cellules la capacité à croître à 36°C. De plus, il est possible que le clone YE2843 soit un révertant, c'est-à-dire que la souche ait perdue la mutation la rendant thermosensible (*cdc13-1*) et exprime un allèle de type sauvage (*CDC13*). Un séquençage du locus *CDC13* permettrait de vérifier ceci de façon conclusive. Il est à noter aussi que les profils obtenus par cryométrie en flux des cellules YE2843 *cdc13-1 clb3,4,5Δ* cycles, tout comme son contrôle *clb3,4,5Δ*, ne suggère pas une perturbation du cycle cellulaire (figure 3.8B). Une telle distribution est inattendue pour les cellules *clb3,4,5Δ* à la lumière des publications antérieures montrant une progression ralentie dans le cycle cellulaire et une large population de cellules accumulée en phases S/G2 (Epstein et Cross, 1992).

### **3.2.2 La délétion de toutes les cyclines de la phase S ne pas suffisante pour supprimer la résection aux télomères et la thermosensibilité des cellules *cdc13-1***

Comme mentionné plus haut, les études antérieures ont également démontré que la délétion de toutes les quatre cyclines de la phase S est létale (Epstein et Cross, 1992 ; Schwob et Nasmyth, 1993). Cependant, la viabilité de la souche mutante ayant une quadruple délétion de toutes les cyclines de la phase S peut être maintenu viable par l'expression d'une seule cycline, Clb5. Ainsi, j'ai pu analyser l'effet de la quadruple délétion, en combinaison avec soit l'allèle *CDC13* ou *cdc13-1*, grâce à l'expression contrôlée du gène *CLB5* à partir du promoteur *GALI,10*. Dans

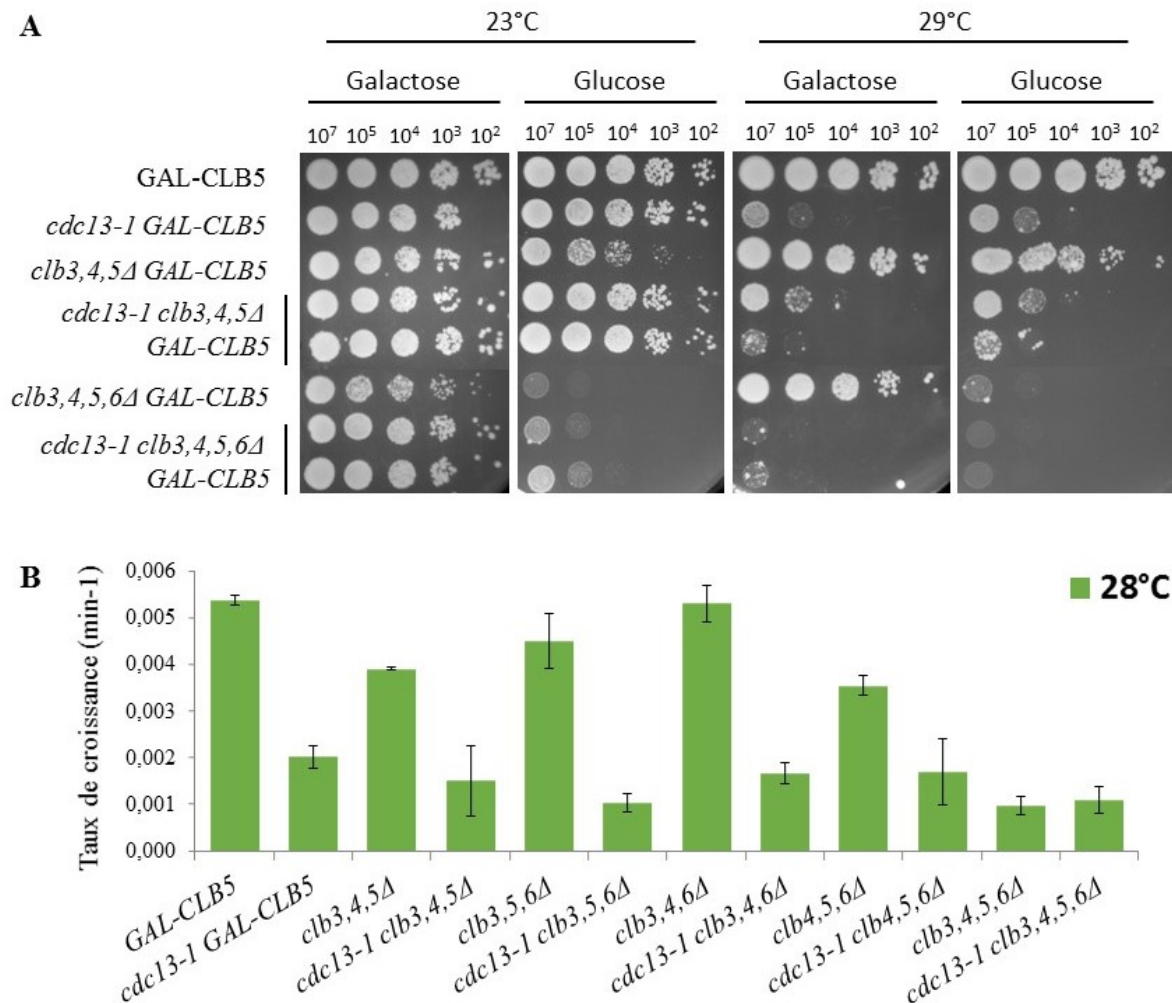
un milieu où la source de carbone est le galactose (YEPG), les cellules seront en mesure de maintenir la viabilité en exprimant le gène *CLB5*. La suppression rapide du promoteur *GALI,10* se fait par l'ajout d'un milieu où la source de carbone est le glucose (YEPD), suite à un lavage des cellules avec de l'eau stérile. Bien que l'inhibition de l'expression de *CLB5* dans un milieu YEPD soit presque instantanée, la protéine Clb5 est surexprimée sous le promoteur *GALI,10* par rapport du niveau d'expression à partir de son promoteur endogène. La protéine Clb5, étant une protéine instable comme toutes les cyclines, est éliminée dans la cellule par l'action du protéasome, mais le temps nécessaire pour épuiser complètement l'excès de Clb5 suite à sa surexpression est inconnu. Ainsi, pour s'assurer que les résultats reflètent vraiment la situation dans une quadruple délétion des cyclines de la phase S, j'ai commencé par déterminer le temps nécessaire pour dégrader complètement Clb5 dans les cellules après l'introduction du milieu YEPD. Des échantillons récoltés à différents intervalles de temps après le changement du milieu étaient ensuite analysés par immunobuvardage de type western pour visualiser la présence de Clb5. La figure 3.10 montre que le temps minimal nécessaire aux cellules pour dégrader complètement le Clb5 dans un milieu YEPD, lorsqu'exposée à une température ambiante (23°C), est de deux heures, puisque la bande correspondant à la protéine Clb5 à ce temps est pratiquement absente et moindre que le niveau endogène de la protéine Clb5 (figure 3.10; comparer les pistes *WT* et 120min. dans milieu avec 2% glucose). Lorsque ces tests étaient effectués, l'effet de la concentration du galactose sur la surexpression du gène *CLB5* a été également étudié. Comme on le voit dans la figure 3.10, le niveau d'expression est le même pour les deux différentes concentrations testées, de 0,5% et de 2% galactose, indiquant que la surexpression ne peut être modulée en fonction de la concentration du sucre ajouté dans le milieu.





**Figure 3.10 La cinétique de dégradation de la protéine Clb5 suite à la suppression de l'expression de GAL-CLB5 en présence du glucose.** La souche YE3575 a été poussée dans un milieu riche (YEPG) en présence de soit 0,5% ou 2% galactose (pistes 0 min.) avant de changer la source du carbone pour glucose (YPED). Des extraits protéiques ont été préparés après 30 min, 60 min, et 120 min. de croissance en présence de 2% glucose et analysés à l'aide d'anticorps contre la protéine Clb5. L'étoile indique une bande non spécifique qui sert d'un contrôle interne de chargement.

Pour valider nos observations sur la dégradation de Clb5, ainsi que la construction *GAL-CLB5* était bel et bien fonctionnelle, des tests de croissance sur un milieu solide et dans culture liquide ont été effectués. Premièrement, la croissance des cellules en présence de galactose ou glucose, soit à une température permissive de 23°C ou restrictive de 29°C pour l'allèle *cdc13-1*, a été examinée par la méthode de dilutions en série à partir de cultures en phase exponentielle (figure 3.11A). Lorsque l'expression de *CLB5* est réprimée en présence du glucose, la croissance des cellules *clb3,4,5,6Δ* doit être inhibée. En effet, à une température permissive (23°C) la souche *clb3,4,5,6Δ* n'est pas en mesure de pousser sur un milieu contenant du glucose, mais pousse bien en présence du galactose (figure 3.11A). À une température restrictive (29°C), la croissance de cette souche en galactose est inhibée, ce qui suggère que l'allèle *cdc13-1* est fonctionnel. Par contre, comme vu précédemment, la triple délétion *clb3,4,5,Δ* est viable lorsque l'expression de *CLB5* est inhibée en présence du glucose. De plus, à une température non-permissive pour l'allèle *cdc13-1*, la croissance de la souche *clb3,4,5Δ* est compromise de façon similaire à la souche contrôle *cdc13-1*. Ce dernier résultat confirme que les observations faites avec la série de triples délétions et la conclusion que la triple délétion *clb3,4,5Δ* n'est pas capable de supprimer la thermosensibilité des cellules *cdc13-1*.



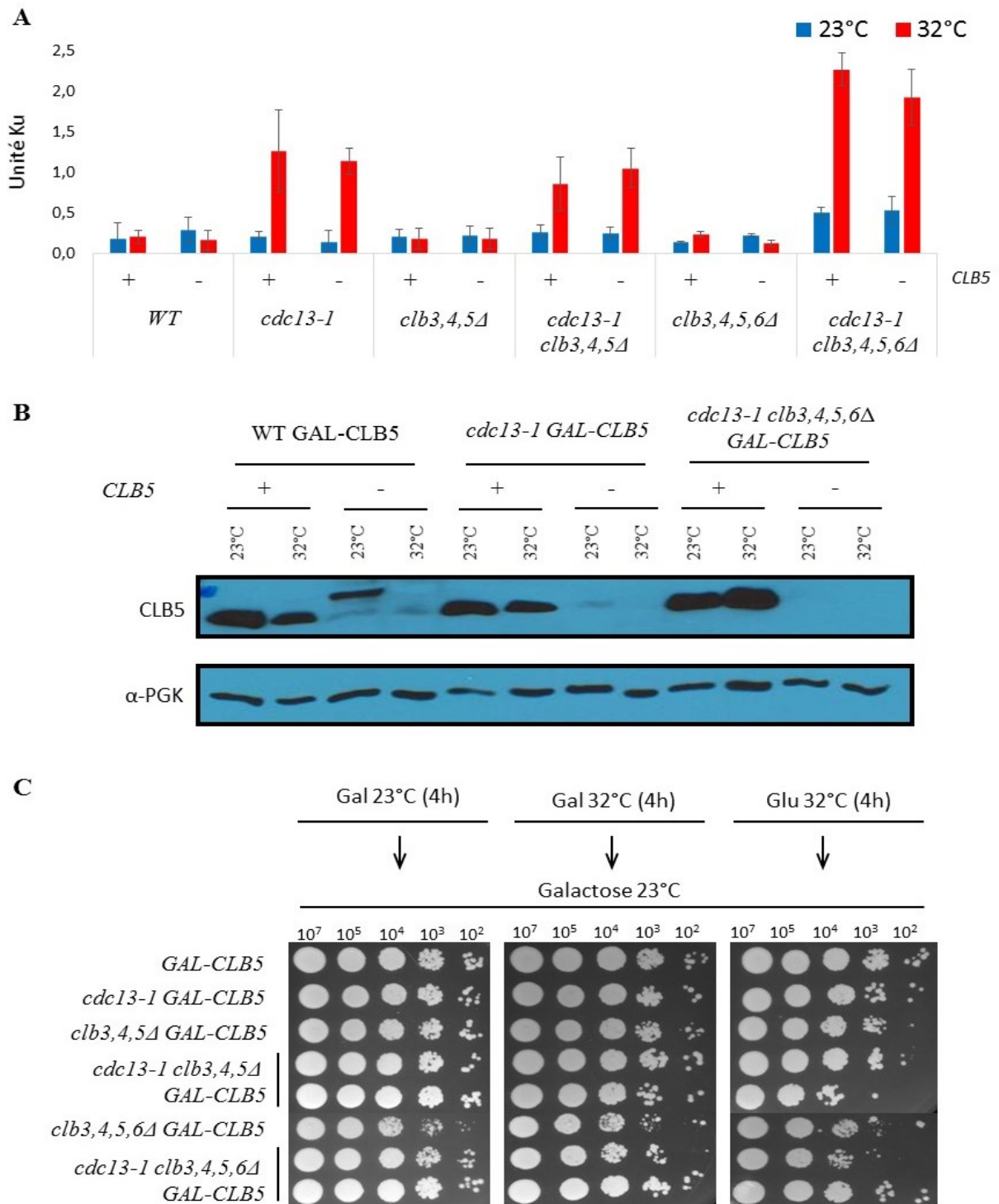
**Figure 3.11 Tests de croissance confirmant que la construction *GAL-CLB5* est fonctionnelle.** (A) Dilutions en série des souches de levures WT (YE3552), *cdc13-1* (MKY9), *clb3,4,5Δ* (YE3575), *cdc13-1 clb3,4,5Δ* (YE3665 et YE3666), *clb3,4,5,6Δ* (MVY622) et *cdc13-1 clb3,4,5,6Δ* (YE3644 et MVY627), toutes contenant le gène *CLB5* sous promoteur *GAL1,10* (*GAL-CLB5*), ont été incubées à une température permissive (23°C) et restrictive (29°C) sur un milieu où la source de carbone est le galactose ou le glucose. (B) Les souches WT (YE3552 et YE3553), *cdc13-1* (MKY9 et MKY10), *clb3,4,5Δ* (YE3575), *cdc13-1 clb3,4,5Δ* (YE3665 et YE3666), *clb3,5,6Δ* (YE3578), *cdc13-1 clb3,5,6Δ* (MVY637 et MVY640), *clb3,4,6Δ* (YE3577), *cdc13-1 clb3,4,6Δ* (MVY624 et MVY625), *clb4,5,6Δ* (MVY634), *cdc13-1 clb4,5,6Δ* (MVY631), *clb3,4,5,6Δ* (MVY622) et *cdc13-1 clb3,4,6Δ* (MVY627 et MVY630), contenant la construction *GAL-CLB5*, ont été analysés pour la croissance à une température de 28°C en présence de glucose de la même manière que dans la figure 3.1D et le taux de croissance a été calculé par le logiciel GrowthRates.

Ensuite, l'effet des mêmes délétions de cyclines sur la croissance a été évalué dans une microplaque à 96 puits par une courbe de croissance à partir d'une culture liquide dense. La microculture diluée a été incubée dans un milieu YEPD pendant 36 heures à 28°C et le taux de croissance ( $\text{min}^{-1}$ ) a été calculé à partir des données transformées en logarithme (figure 3.11B). Ces analyses démontrent encore une fois que la croissance de cellules *clb3,4,5,6Δ* est inhibée en présence du glucose et que toutes les combinaisons de trois délétions de cyclines de la phase S sont thermosensibles (figure 3.11B). En fonction des résultats obtenus par les deux tests de croissance nous pouvons conclure que l'allèle thermosensible *cdc13-1* et la construction *GAL-CLB5* dans nos souches d'intérêt sont fonctionnels.

Puisque les tests de croissance ont montrés que la quadruple délétion de cyclines de la phase S est non viable, le seul moyen d'analyser l'effet de ces délétions en combinaison avec l'allèle *cdc13-1* est de comparer les taux de résection dans les cellules *cdc13-1 clb3,4,5,6Δ GAL-CLB5* incubées en présence du glucose versus galactose. Dans ces expériences, avant la déprotection des télomères pour une durée de quatre heures, les cultures ont été préincubées pendant deux heures dans un milieu glucose à une température permissive, afin d'éliminer complètement Clb5 (figure 3.10). La quantité d'ADN simple brin accumulé aux télomères suite à l'exposition à 32°C est similaire pour les cellules *cdc13-1 clb3,4,5,6Δ* incubées dans galactose (+ *CLB5*) ou glucose (- *CLB5*) (figure 3.12A). Cette accumulation d'ADN sb est spécifique pour la souche contenant l'allèle *cdc13-1* et n'est pas détectée dans la souche contrôle *clb3,4,5,6Δ* incubée à 32°C. La vérification de l'expression du gène *CLB5* sous différentes conditions expérimentales confirme que la protéine Clb5 n'est pas présente dans les échantillons extraits à partir de cellules incubées en glucose (figure 3.12B). Ainsi, la quadruple délétion de toutes les cyclines de la phase S ne suffit pas pour supprimer la dégradation des télomères déprotégés. La quantification des signaux dans les cellules *cdc13-1 clb3,4,5Δ* exposées à 32°C indique aussi que la résection n'est pas supprimée dans ce mutant. Notamment, le niveau de l'ADN simple brin dans la souche *cdc13-1 clb3,4,5,6Δ* est plus élevé que celui observé pour la souche *cdc13-1 clb3,4,5Δ* ou la souche contrôle *cdc13-1* (figure 3.12A). Pour

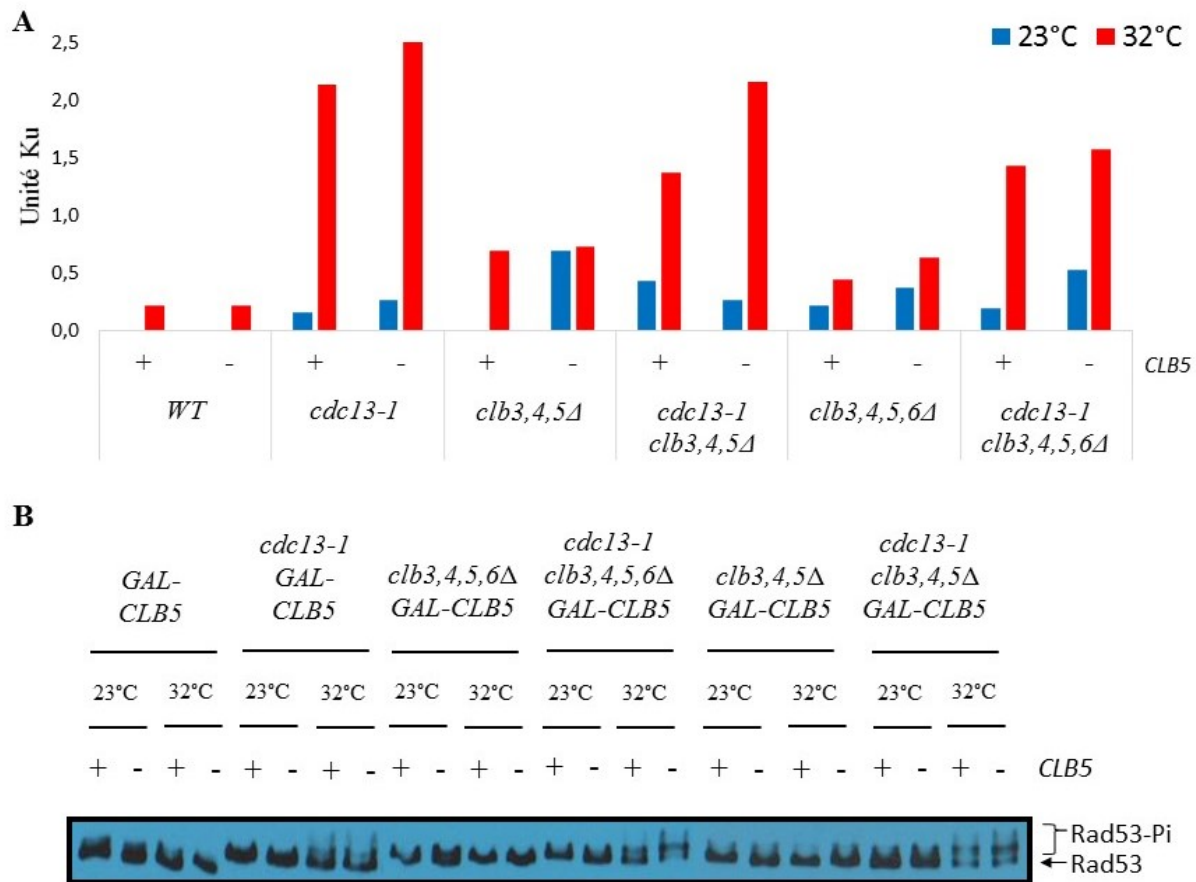
déterminer si cette quantité élevée d'ADN sb dans les cellules *cdc13-1 clb3,4,5,6Δ* pourrait être due à une mort cellulaire accélérée suite à l'inactivation simultanée des cyclines et de Cdc13 pour la durée de notre démarche expérimentale, la viabilité des cellules a été vérifiée après l'exposition aux différentes conditions. En effet, l'accumulation de l'ADN sb pourrait provenir d'une dégradation générale d'ADN génomique ou de l'incapacité des cellules de compléter la réplication d'ADN lors de la mort cellulaire sous ces conditions.

À partir des cultures exposées aux différentes conditions, la viabilité des cellules a été évaluée par dilutions en série et une incubation sur un milieu riche contenant le galactose à une température permissive de 23°C (figure 3.12C). En général, la croissance des souches testées ne nous laisse pas croire que la viabilité des cellules était grandement compromise au cours des différents traitements. La viabilité des cultures exposées à 32°C dans un milieu galactose est comparable à celle des contrôles incubés toujours en galactose à 23°C (figure 3.12C, panneaux de la gauche et du centre). Une légère diminution de la viabilité est observée seulement dans certains clones des souches *cdc13-1 clb3,4,5Δ* et *cdc13-1 clb3,4,5,6Δ* qui étaient incubées en présence du glucose à 32°C pendant quatre heures. Ainsi, une corrélation entre la plus grande quantité d'ADN sb et la viabilité des cellules *cdc13-1 clb3,4,5,6Δ* exposées à 32°C est difficile à établir pour les raisons suivantes. Le niveau d'ADN sb est autant élevé dans les cellules incubées en présence du galactose qu'en présence du galactose à 32°C mais la viabilité des cellules incubées en galactose n'est pas diminuée (figure 3.12C, au centre). De plus, si l'inactivation de toutes les cyclines abouti à une mortalité plus rapide et l'accumulation d'ADN sb, ces effets devraient se manifester aussi dans la souche contrôle *clb3,4,5,6Δ*, ce qui n'est pas le cas (figure 3.12A et C).



**Figure 3.12 Évaluation d'effet de la délétion des S cyclines sur la résection et la viabilité après la déprotection des télomères.** (A) L'ADN sb aux télomères des souches WT (YE3552 et YE3553), *cdc13-1* (MKY9 et MKY10), *clb3,4,5Δ* (YE3575), *cdc13-1 clb3,4,5Δ* (YE3665 et YE3666), *clb3,4,5,6Δ* (MVY622) et *cdc13-1 clb3,4,5,6Δ* (YE3644 et MVY627), toutes contenant le gène *CLB5* sous promoteur *GAL1,10* (*GAL-CLB5*), a été quantifié par la technique d'hybridation non dénaturante de même manière que celle-ci décrite dans la figure 3.2. (B) Les souches de levures WT *GAL-CLB5* (YE3552), *cdc13-1 GAL-CLB5* (MKY10) et *cdc13-1 clb3,4,5,6Δ GAL-CLB5* (YE3644) ont été analysés pour la présence de bandes *CLB5* de manière similaire à celle dans la figure 3.3. (C) Dilutions en série des souches de levures identifiées ci-haut ont été incubées à une température permissive (23°C) et restrictive (29°C) sur un milieu où la source de carbone est le galactose ou le glucose.

Jusqu'à présent, toutes les expériences ont été effectuées avec des cultures de cellules asynchrones en croissance exponentielle. D'abord, nous avons voulu confirmer ces résultats dans des cellules qui ne se divisent pas pour exclure des influences de la division ou la réplication sur la résection et l'activation de la DDR en absence des cyclines de la phase S. À cette fin, des cultures exponentielles des souches *cdc13-1 clb3,4,5,6Δ*, *cdc13-1 clb3,4,5Δ* et leurs souches contrôles appropriées ont été synchronisées avec le nocodazole, qui bloque les cellules en métaphase, avant d'être exposées à 32°C pour une durée de quatre heures dans un milieu YEPD ou YEPG. Des échantillons ont été ensuite récoltés pour extraire l'ADN et quantifier l'ADN sb, et pour analyser la phosphorylation de Rad53. La figure 3.13 présente les résultats provenant d'une telle expérience. Les observations avec les cellules arrêtées en G2/M au niveau de la quantification de l'ADN simple brin (Figure 3.13A) et l'activation de la DDR et phosphorylation de Rad53 (Figure 3.13B) concordent avec les résultats obtenus avec des cellules en division. L'ensemble de ses résultats suggère que la délétion de toutes les cyclines de la phase S ne permet pas de renverser les effets de l'allèle *cdc13-1* aux télomères à des températures restrictives.



**Figure 3.13 Évaluation d'effet de la délétion des S cyclines sur la résection et l'activation de la DDR en absence de division.** (A) Les souches WT (YE3552 et YE3553), *cdc13-1* (MKY9 et MKY10), *clb3,4,5Δ* (YE3575), *cdc13-1 clb3,4,5Δ* (YE3665 et YE3666), *clb3,4,5,6Δ* (MVY622) et *cdc13-1 clb3,4,5,6Δ* (YE3644 et MVY627) dans un background GAL-CLB5 ont été synchronisées en G2/M avec Nocodazole et exposées pour une durée de 4 heures à une température permissive (23°C) ou non-permissive (32°C). L'ADN simple brin aux télomères a été quantifiées par la technique d'hybridation non dénaturante et les valeurs ont été normalisées et exprimées en unité Ku. (B) Des échantillons protéiques des souches de levures WT (YE3553), *cdc13-1* (MKY10), *clb3,4,5Δ* (YE3575), *cdc13-1 clb3,4,5Δ* (YE3665), *clb3,4,5,6Δ* (MVY622) et *cdc13-1 clb3,4,5,6Δ* (MVY627) ont été analysés par immunobuvardage de type western pour visualiser l'activation de checkpoint en utilisant des anticorps contre Rad53.

## CHAPITRE 4

### MODIFICATION ET ADAPTATION DE LA TECHNIQUE QAOS À L'UTILISATION DU SYBR Green

#### 4.1 INTRODUCTION

L'ADN simple brin (ADN sb) est un produit intermédiaire transitoire étroitement relié au métabolisme d'ADN cellulaire, il est généré lors de processus très variés tel que la réplication (Okazaki *et al.*, 1968 ; Henson, 1978 ; Wanka *et al.*, 1977), la transcription (Tapiero *et al.*, 1976), l'apoptose (Watanabe *et al.*, 1999 ; Frankfurt *et al.*, 1996), la réparation de l'ADN (Raderschall *et al.*, 1999), la recombinaison mitotique et méiotique (Sugawara *et al.*, 1992 ; Sun *et al.*, 1991) et les télomères (Dionne et Wellinger, 1996 ; Makarov *et al.*, 1997 ; Garvik *et al.*, 1995 ; Polotnianka *et al.*, 1998). Étant donné son omniprésence, sa nature instable et sa prédisposition à la mutagenèse, et afin de mieux comprendre les différentes implications possibles de l'ADN sb dans les cellules, il est primordial d'avoir des outils qui nous permettront de détecter et de quantifier le simple brin. Il existe nombreuses méthodes qui permettent la détection de l'ADN sb comme les anticorps monoclonaux (Frankfurt *et al.*, 1996 ; Raderschall *et al.*, 1999), le gel d'électrophorèse bidimensionnel (Garvik *et al.*, 1995), l'hybridation d'acides désoxyribonucléiques sous conditions non dénaturantes (Wellinger *et al.*, 1993 ; Dionne et Wellinger, 1996) ou dénaturantes (Garvik *et al.*, 1995 ; Lydall *et al.*, 1996), les techniques à la base de PCR quantitative (Booth et Lydall, 2001 ; Zierhut et Diffley, 2008) et l'électrophorèse à champ pulsé (Westmoreland et Reznik, 2009). Chacune de ses différentes techniques ont des avantages et désavantages qui leur sont propres. Dans les prochains paragraphes, une des techniques à la base PCR, nommée QAOS (Booth *et al.*, 2001), sera décrite davantage et comparée à l'hybridation non dénaturante (Dionne et Wellinger, 1996) que j'ai utilisée au cours de ma maîtrise.



#### 4.1.1 Comparaison entre l'hybridation non dénaturante et le QAOS

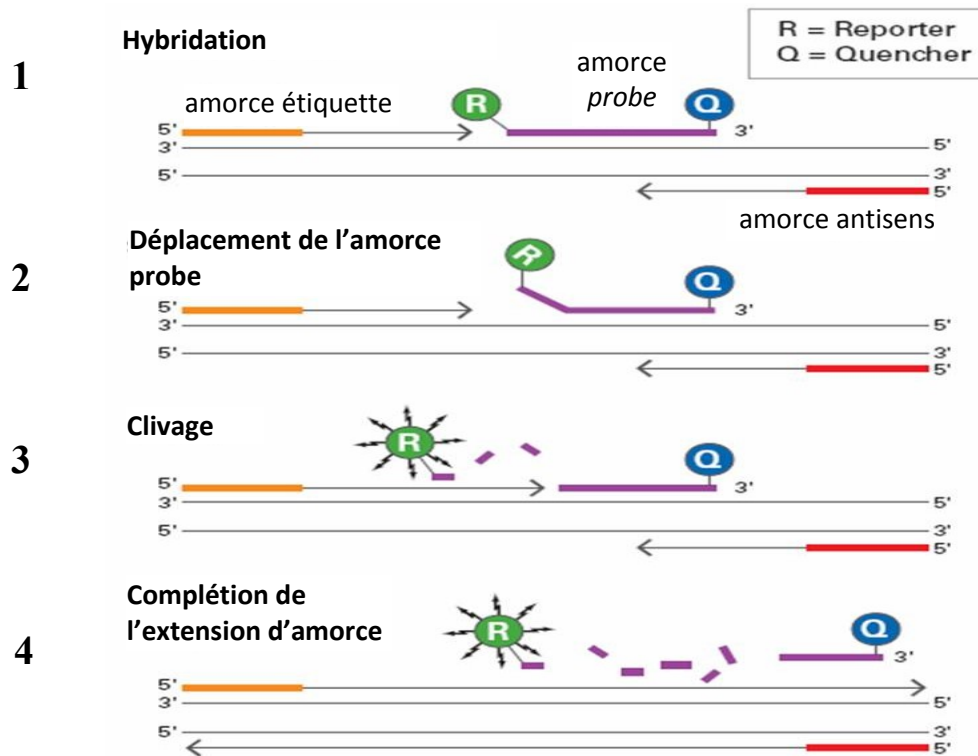
L'hybridation non dénaturante et récemment le QAOS sont très utilisés dans les études sur la détection de la résection aux télomères déprotégés. Ces deux techniques ciblent à quantifier et mesurer le simple brin présent aux extrémités des chromosomes par deux méthodes différentes. La technique du QAOS (pour *Quantitative Amplification Of Single-stranded DNA*) ne nécessite pas une sonde radioactive, comme c'est le cas dans la technique de l'hybridation non dénaturante, pour détecter et mesurer l'ADN simple brin. Le QAOS détecte et quantifie le simple brin par la fluorescence. Les auteurs qui ont mis au point la technique du QAOS ont pu identifier et construire plusieurs paires d'amorces spécifiques pour plusieurs loci qui se situent tous en amont des répétitions télomériques G/C riche et sont présents sur les chromosomes V-R et VI-R de la levure (Booth *et al.*, 2001). Cette approche se base sur la PCR quantitative (qPCR) afin de quantifier pour ensuite analyser le simple brin généré suite à un dommage à l'ADN ou par la résection aux télomères déprotégés. Ainsi, la quantification de l'ADN sb ne se fait pas sur les extrémités de tous les chromosomes de la levure, mais à des séquences spécifiques aux loci des chromosomes reconnues par les paires d'amorces conçues. En conséquence, les signaux de fluorescence dans une telle qPCR sont rendus spécifiques à l'endroit de l'amplification voulue. Cependant, dans l'hybridation non dénaturante seule l'ADN simple brin ayant la séquence répétitive G/C riche sera mesuré et quantifié. En conséquence, il existe une certaine faiblesse dans la méthode de détection du simple brin par la technique d'hybridation non dénaturante, car nous ne pourrions pas faire la distinction entre des mutants qui affectent différemment le niveau de la dégradation du brin C-riche. Grâce à la possibilité de tester plusieurs paires d'amorces au long du bras d'un chromosome, le QAOS permet de suivre la dynamique de la résection chez la levure. Cependant, la technique d'hybridation non dénaturante est la méthode de choix lors de la mesure de la résection dans les répétitions télomériques mêmes, surtout pour ceux des mammifères qui peuvent mesurer plusieurs kilobases. Par ce fait, dans ce contexte, le QAOS ne pourra pas être utilisé, car cette technique ne permettra pas de visualiser l'ADN sb aux séquences répétitives G/C riche.

## 4.1.2 Principe du QAOS

### 4.1.2.1 La technique QAOS originelle

La technique originelle du QAOS a été développée pour une qPCR de type Taqman, où l'amplification de l'ADN observé est mesurée par la fluorescence d'une amorce dite *probe* qui est spécifique au fragment d'ADN simple brin amplifié. La technique nécessite quatre amorces : l'amorce *probe*, l'amorce étiquetée, l'amorce étiquette et l'amorce antisens. La figure 4.1 permet de bien illustrer le principe de détection de l'ADN sb par la qPCR de type Taqman, ce qui constitue la deuxième étape de la méthode QAOS. Tout d'abord, cette étape est précédée par l'hybridation à une température plus petite ou égale à 45°C de l'amorce *probe* et de l'amorce étiquetée à leur séquence spécifique à un locus donnée de la levure. L'hybridation de ces deux amorces a lieu seulement en présence de l'ADN simple brin. L'amorce *probe* est composée d'une petite séquence d'oligonucléotides qui est liée en 5' par un fluorophore et en 3' par une protéine dite *quencher* qui a comme rôle de capter la fluorescence émise par le fluorophore. L'amorce étiquetée possède un site unique à l'extrémité 5' dont la séquence ne se retrouve pas dans le génome de la levure. Cette amorce est présente à une concentration plus faible. La première étape de la méthode comporte de l'extension d'amorce à partir de l'amorce étiquetée qui s'hybride en amont de l'amorce *probe*. La seconde étape est une étape d'amplification du produit obtenu à la première étape. L'amorce étiquette s'hybride spécifiquement sur le site unique en 5' de l'amorce étiquetée. L'amorce antisens est spécifique pour le génome de la levure. À cause qu'à cette étape la température d'hybridation est élevée à la température d'hybridation de l'amorce étiquetée, ceci empêchera son hybridation. La polymérase qui possède une activité exonucléase, une fois rendu à l'amorce *probe*, sera en mesure de digérer l'oligonucléotide ce qui permettra le clivage et la libération du fluorophore qui va émettre de la fluorescence qui sera ensuite captée par la qPCR. La fluorescence émise en fonction de l'amorce

probe clivée va permettre la détection et la quantification de l'ADN simple brin aux locus désirés.



**Figure 4.1 La deuxième étape de la détection de l'ADN simple brin par la qPCR Taqman.** (1) L'amorce probe qui est liée par un fluorophore et une protéine *Quencher* qui à proximité du fluorophore capte la fluorescence s'hybride à sa séquence. À cette étape l'amorce antisens s'hybride et permet de fournir le substrat pour le prochain cycle. (2) L'extension d'amorce par la polymérase va faire (3) déplacer le fluorophore et (4) conduire dans son clivage. Une fois clivé, le fluorochrome va émettre la fluorescence qui sera détectée par la qPCR Taqman. La polymérase va aussi faire déloger l'amorce probe et l'extension d'amorce se poursuivra.  
(Johnson, 2009; <http://www.isu.edu/mls/shields09wikis/parasitology.html>)

Dans notre laboratoire, nous avons voulu mettre au point la technique du QAOS avec les équipements et les matériels qui ont été à notre disposition, afin que les données obtenues puissent compléter et/ou ajouter de l'information aux résultats obtenus par la technique

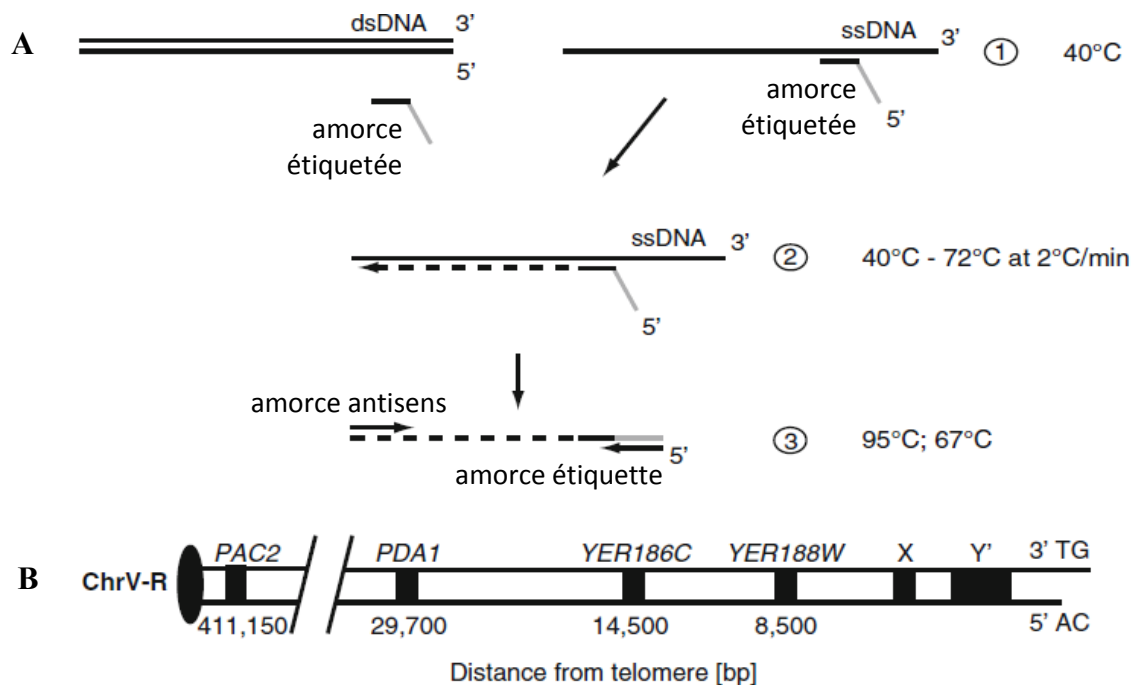
d'hybridation non dénaturante. Nous utilisons les mêmes amorces que ceux mis aux points par Booth *et al.*, (2001), Zubko *et al.*, (2006) et Holstein *et al.*, (2012) sauf que nous n'utiliserons pas une amorce *probe* pour mesurer et quantifier le simple brin. Nous avons choisi le SYBR Green comme moyen de détection et de quantification de l'ADN simple brin. Le fluorophore SYBR Green émet de la fluorescence seulement quand il est intercalé à de l'ADN double brin. Le principal inconvénient relatif à cette méthode de détection est qu'une amplification non spécifique peut être observée et confondue avec l'amplification spécifique de la région de l'ADN voulue, c'est-à-dire qu'il y a une possibilité qu'on obtienne un plus grand bruit de fond. Tout comme dans les publications concernant le QAOS (Booth *et al.*, 2001 ; Zubko *et al.*, 2006 ; Holstein *et al.*, 2012) le mélange réactionnel déjà établi par ses équipes permet toujours, même avec l'omission de la sonde *probe* et le choix d'utiliser SYBR Green comme moyen de mesurer et de quantifier le simple brin aux loci désirés aux télomères, d'obtenir un signal d'amplification issue de la qPCR qui est exploitable, et ce, sans l'ajout de d'autres réactifs. L'analyse de l'ADN simple brin au locus Y'600, qui est présent sur plus de la moitié des extrémités des chromosomes, avec ce mélange réactionnel, nous n'a pas permis d'obtenir une bonne mesure du simple brin. Ainsi nous avons décidé de mesurer le simple brin à partir du locus Y'5000, qui permet d'obtenir des résultats satisfaisants. En effet, il est connu que la résection dans une souche *cdc13-1* dont les télomères ont été déprotégés pour une durée de deux heures à une température non-permissive s'y rend jusqu'au locus Y'5000 (Foster *et al.*, 2006).

#### **4.1.2.2 La technique QAOS mise au point**

La technique QAOS que j'ai utilisée dans mon projet de maîtrise se déroule en deux étapes et utilise 3 amorces :

- une amorce étiquetée qui est spécifique pour un locus donné et qui possède un site unique à l'extrémité 5' de l'oligonucléotide,
- une amorce étiquette qui est complémentaire pour le site unique de l'amorce étiquetée,
- une amorce antisens qui est spécifique pour le locus donné.

La première étape du QAOS consiste d'une rampe où la température augmente graduellement, et ce, à des conditions non dénaturantes. La rampe commence par un cycle de 5 minutes à 40°C, c'est la température à laquelle l'amorce étiquetée peut se fixer au niveau de son locus spécifique (figure 4.2B) et à condition qu'il y a un ADN simple brin (figure 4.2A, l'étape 1). La température augmente de manière graduelle et lente de 2°C par minute jusqu'à atteindre 72°C (figure 4.2A, l'étape 2). Cette augmentation graduelle de la température permet l'extension d'amorce à partir de l'amorce étiquetée. Comme il a été mentionné plus haut, l'amorce étiquetée possède un site unique en 5' qui ne se retrouve pas dans le génome de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Après cette première étape d'extension d'amorce en condition native s'en suit la deuxième étape de la PCR quantitative, constituée de cycles de PCR régulières (figure 4.2A, l'étape 3). À cette étape, le petit fragment du produit simple brin de la première étape s'amplifie à l'aide des amorces étiquette et antisens présentes dans le même puits. L'amorce étiquette ne peut que se fixer au site unique présente sur l'amorce étiquetée, puisque la séquence de l'amorce étiquette n'est pas présente dans le génome de *Saccharomyces cerevisiae*. Ainsi, seul un ADN produit pendant la première étape peut être amplifié lors de l'étape de PCR régulière. Ce qui signifie que la quantité d'ADN produit durant la première étape est directement liée à la quantité d'ADN simple brin présent dans le locus testé. De plus, lors de la qPCR, la température est trop élevée pour permettre l'hybridation de l'amorce étiquetée sur l'ADN.



**Figure 4.2 (A) Les différentes étapes de la technique QAOS (Amplification quantitative de l'ADN simple brin par PCR) et (B) les différents loci présents sur le chromosome V du bras droit (R).** (Booth et Lydall, 2001)

## 4.2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 4.2.1 Extraction et purification de l'ADN génomique

Les échantillons de cellules congelées ont été lavés avec 100µL eau stérile et transférées dans un microtube de 1,5mL stérile et identifié. Les cellules ont été resuspendues dans 200µL tampon de lyse froide (2% Triton X-100, 1% SDS, 10mM Tris-HCl pH8, 100mM EDTA et 100mM NaCl). Ensuite, nous avons ajouté des billes de verres stériles de 425-600µm de diamètre (Sigma-Aldrich, MO, U.S.A.) de façon à ce qu'il reste 2mm de liquide à la surface et 200µL

d'une solution de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (24:25:1). Le tube a été bien fermé avec du parafilm. La lyse mécanique a été faite à l'aide d'un homogénéisateur FastPrep® -24 (MP biomedical, CA, USA) à une puissance de 5.5 pendant 20sec. La lyse mécanique a été répétée deux autres fois. Entre chaque essai, les tubes ont été maintenus sur glace pendant 5min. Après une brève centrifugation, 200µL TE (10mM Tris-HCl pH8 et 1mM EDTA) a été ajouté au lysat et le tout a été bien mélangé et centrifugé à 12500rpm pendant 10min à 4°C. La phase aqueuse a été transférée dans un nouveau microtube et 1mL d'EtOH froide 100% a été ajouté, afin de permettre la précipitation de l'ADN génomique (ADNg) à température pièce pendant 5min. Le tube a été centrifugé à 12500rpm pendant 3min à température pièce. Le culot séché à l'air pendant 5min a été dissous et traité avec 400µL d'une solution TE/RNase A (7,5µg/mL de TE) à 37°C pendant 30min. Pour une seconde fois l'ADN a été précipité avec 13µL NaAc pH5,2 et 1mL EtOH froide 100% suite à une incubation à température pièce pendant 15min et une centrifugation à 12500rpm pendant 3min à température pièce. Le culot a été ensuite lavé avec 400µL EtOH froide 70% et le culot a été séché dans la hotte chimique pendant 30min. Finalement, l'ADN séché est dissous dans 40µL de TE et laissé à 4°C pour permettre l'homogénéisation de l'échantillon.

#### **4.2.2 Quantification d'ADN et équilibrage des échantillons**

Après une incubation durant la nuit à 4°C, on a dosé l'ADN à l'aide d'une courbe standard du phage λ dilué dans du TE (2; 1; 0,5; 0,25; 0,125 et 0µg/mL) dans une plaque noire à 96 puits. Dans un puits, 2µL de l'échantillon a été ajouté dans 200µL d'une solution de 1µg/mL Hoechst (10mg/mL) avec 1X TNE filtré pH7,4. La lecture de la fluorescence (360/460nm) a été faite à l'aide d'un lecteur de plaque Synergy HT (BioTek, VT, U.S.A.). Dans de nouveaux microtubes de 1,5mL stériles et identifiés, les échantillons et le standard ont été dilués de façon à obtenir une concentration finale de 10ng d'ADN par µL en utilisant l'eau stérile pour compléter le volume.

### 4.2.3 Préparation des microplaques à 96 puits pour qPCR

Dans une microplaque à 96 puits propres pour qPCR, la plaque doit contenir en duplicata ou en triplicata :

- des puits pour le contrôle négatif, qui est composé de TE et de notre mixte de QAOS;
- des puits pour les standards : 100% (10ng/μL), 20% et 4% d'ADN dénaturés complétés avec de l'ADN natif pour obtenir 20ng d'ADN final par puits (0%, 80% et 96% d'ADN natifs, respectivement). Il est également possible d'ajouter des puits pour un contrôle positif en utilisant 100% d'ADN natifs;
- des puits pour les échantillons, avec une quantité finale de 20ng d'ADN/puits.

Le volume final par puits est de 10μL, où 2μL est pour l'ADN et 8μL est pour le mix réactionnel. Le mix réactionnel pour le QAOS avec les concentrations stock ( $C_i$ ) et les concentrations finales ( $C_f$ ) est énuméré dans le tableau 4.1. La liste des amorces utilisées est décrite dans le tableau 4.2. Le programme de QAOS utilisé est décrit dans le tableau 4.3.

**Tableau 4.1 Mix réactionnel pour le QAOS**

Produit	$C_i$	$C_f$	Volume final par puits (μL)
ADN	10ng/μL	20ng	2
H <sub>2</sub> O stérile			5,1
Tampon Taq B	10X	1X	1
dNTP	10mM	200nM	0,2
Amorce étiquetée	3μM	30nM	
Amorce étiquette	30μM	300nM	1
Amorce antisens	30μM	300nM	
Sybr Green	10X	0,5X	0,5
Taq B	5u/μL	1u/μL	0,2



**Tableau 4.2 Amorces utilisées pour la quantification d'ADN total et pour le QAOS**

Amorce	Type d'amorce	Locus	Séquence
M310	antisens	<i>PAC2</i> (GT)	5' AATAACGAATTGAGCTATGACACCAA 3'
M322	antisens	<i>PAC2</i> (AC)	5' AGCTTACTCATATCGATTTCATACGACTT 3'
M521	étiquetée	<i>Y'5000</i> (GT)	5' TGCCCTCGCATCGCTCTC <b>ga</b> aacaaagtcagtga 3'
M520	étiquette	<i>Y'5000</i> (GT)	5' TGCCCTCGCATCGCTCTC <b>GAA</b> 3'
M517	antisens	<i>Y'5000</i> (GT)	5' GTCCTGGAACGTTGTCACGAAAAAGC 3'
Q267	étiquetée	<i>YER188W</i> (GT)	5' AAGGAGCGCAGCGCCTGT <b>Acc</b> tagcgtgat 3'
Q234	étiquette	<i>YER188W</i> (GT)	5' AAGGAGCGCAGCGCCTGT <b>ACCA</b> 3'
Q625	antisens	<i>YER188W</i> (GT)	5' AACGTACAGGTTACGATCGCGTCATTTTA 3'

**Tableau 4.3 Programme de QAOS utilisé par le qPCR**

Étapes	Cycle(s)	Température (°C)	Durée/cycle
<b>Hybridation initiale</b>	1 fois	40°C	5 minutes
<b>Synthèse initiale</b>	1 fois	40 à 72°C (2°C/minute)	1 minute
<b>Dénaturation initiale</b>	1 fois	95°C	1 minute
<b>Dénaturation</b>	40 fois	95°C	15 secondes
<b>Hybridation/synthèse</b>		67°C	1 minute
<b>Melt Curve</b>	1 fois	65 à 95°C (0,5°C/5sec)	5 secondes

### 4.3 RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les études faites avec le QAOS ont permis de savoir que la résection chez les cellules *cdc13-1* exposées pour une durée de deux heures à des conditions restrictives peut se rendre à plusieurs kilobases des répétitions télomériques. Pour mon étude, nous avons choisi d'analyser le niveau de la résection au locus *Y'5000* (une région sous-télomérique à 5000 pb de l'extrémité du chromosome) (figure 4.2B). Il est également possible de mesurer l'ADN sb avec des paires d'amorces qui sont spécifiques pour des locus plus près des séquences répétitives double brin,

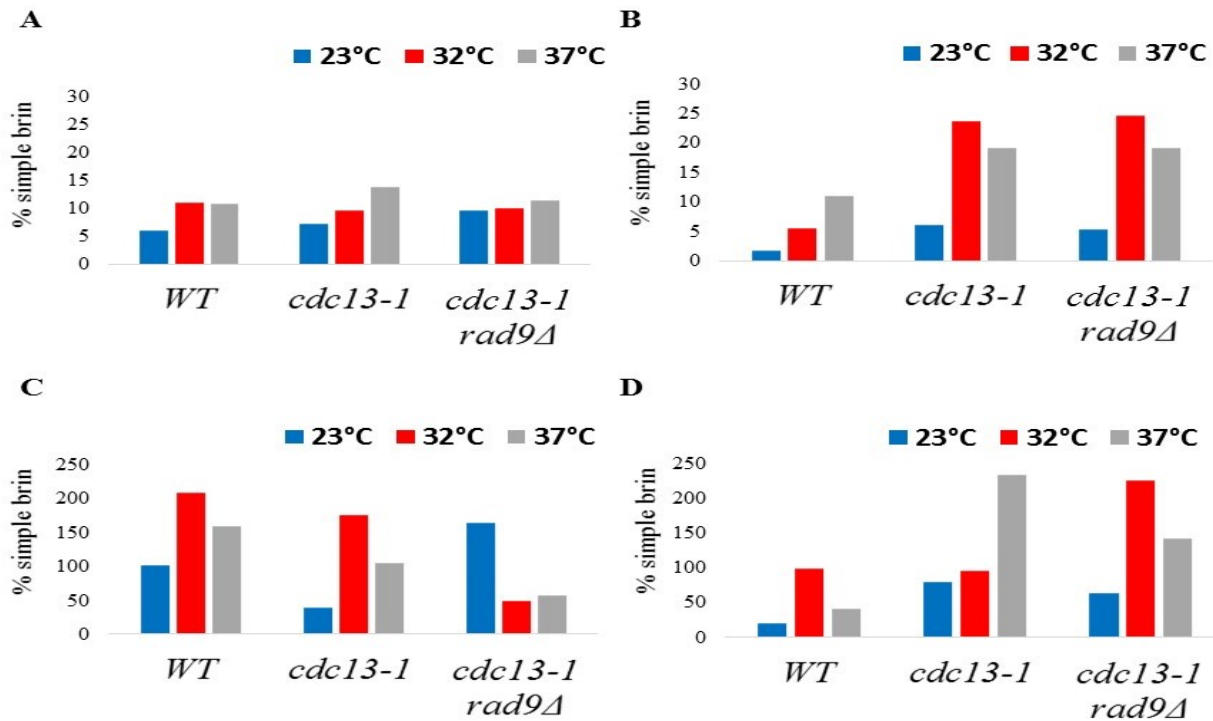
comme Y'600 (figure 4.2B). Cependant, même après plusieurs mises au point, nous ne sommes pas arrivés à éliminer les produits non spécifiques visualisable sur un gel d'agarose coloré avec du bromure d'éthidium (données non montrées). En effet, j'obtenais un % de simple brin de plus de 20% lorsque la quantification de l'ADN sb se faisait au locus Y'600 pour une souche type sauvage exposée à 23°C. De plus, il n'y avait aucune répétabilité entre deux expériences où l'échantillon était le même. Nous avons proposé qu'un % simple brin plus petit ou égale à 5% pour une souche type sauvage incubée à température pièce soit acceptable. Il est probable que la quantification de l'ADNg faite par Hoeschst ne nous permet pas d'obtenir la même concentration finale obtenue par Booth et Lydall (2011), par exemple une quantité de 10ng/μL mesurée avec notre méthode de quantification peut correspondre en réalité à 20ng/μL d'ADNg mesuré par Booth *et al.* (2001). Ainsi, j'ai décidé de suivre la méthode de quantification utilisée par Booth et Lydall (2011), afin d'améliorer la qualité de mes analyses. Les auteurs avaient quantifié leur ADNg à partir d'un standard nommé *Gold standard*. L'ADN utilisé pour la quantification des extraits en ADN des échantillons se fait par l'ADN servant comme standard dans les expériences QAOS. L'ADN standard est quantifié par un spectrophotomètre et des dilutions ont été servies pour quantifier les échantillons. J'ai testé cette méthode de quantification avec mes échantillons, mais il n'y avait pas eu d'amélioration (données non montrées). J'ai également testé différentes quantités totales d'ADN (20ng; 10ng et 5ng) par puits avec l'amorce Y'600 en utilisant notre méthode de quantification par Hoeschst. À une quantité de 5ng d'ADN par puits, nous avons pu diminuer le % simple brin à moins de 5%, or nous avons perdu la différence entre les différentes conditions d'incubation (données non montrées). Par ce fait, nous avons décidé d'analyser la résection par des paires d'amorces spécifiques pour le prochain locus, Y'5000, qui est en amont du locus Y'600.

Dans mes expériences, les valeurs de Cq mesuré par le qPCR est convertie en pourcentage d'ADN simple brin (% ADN sb) à l'aide d'une courbe de croissance qui correspond à différent pourcentage d'ADN dénaturé et ajusté avec de l'ADN natif. Cq est le cycle de sortie qui correspond au moment où l'amplification à partir du produit obtenu dans l'étape 1 de

l'expérience de QAOS (figure 4.2A) atteint une phase exponentielle. Suite à la conversion en % simple brin, les valeurs obtenues ont été normalisées avec l'ADN total. La quantification de l'ADN total a été faite à l'aide du locus PAC2 (figure 4.2B) avec un programme de qPCR normal ([1] 5min à 94°C; (2) 15sec à 95°C; (3) 1min à 63°C; (4) répéter les étapes [2] et [3] 40 fois et une dernière étape pour le *Melt Curve*).

Avant d'arriver à ses conditions optimisées, plusieurs corrections ont été faites dans le protocole d'extraction de l'ADN de manière à obtenir une bonne qualité d'ADN génomique et dans le mélange réactionnel de façon à obtenir une efficacité entre 95 et 110%. Les différents tests et changements faits au cours de cette étude sont décrits dans les prochains paragraphes. Finalement, la fin de ce chapitre a été dédié à présenter et discuter les résultats obtenus pour les souches *cdc13-1 clb3,4,5Δ GAL-CLB5*, *cdc13-1 clb3,4,5,6Δ GAL-CLB5* et leurs contrôles.

La qualité de l'ADN a été le premier point sur lequel j'ai commencé à travailler. J'ai essayé plusieurs différents protocoles d'extraction d'ADN afin d'obtenir une bonne efficacité. Parmi ses protocoles, j'ai utilisé le protocole d'extraction de l'ADN génomique de levure NIB. Ce protocole consiste à extraire, tout d'abord le noyau avec le spermidine et la spermine, qui sont dans le tampon NIB. Ensuite, l'ADN génomique (ADNg) est extrait avec un tampon de lyse qui contient du Tris-HCl, du NaCl et de l'EDTA. L'ADN est traité avec la RNase A et la protéinase K, afin d'enlever les ARN et les protéines liées sur l'ADN. Techniquement avec ce protocole, j'étais supposée d'avoir une bonne qualité d'ADN. Cependant, ceci n'a pas été le cas. J'ai observé que l'omission du tampon NIB, qui a été remplacé par le tampon de lyse, dans le protocole permettait d'améliorer la qualité des résultats (figure 4.3A-B). Cependant, la quantité d'ADNg extrait était beaucoup réduite. Ainsi, d'autres améliorations devaient être apportées à cause de la perte de la répétabilité entre les expériences QAOS. Par la suite, j'ai fait quelques modifications dans le protocole NIB, afin d'obtenir une bonne qualité et rendement d'ADNg, qui sera reflété par un % ADN sb de moins de 5% pour les échantillons incubés à une



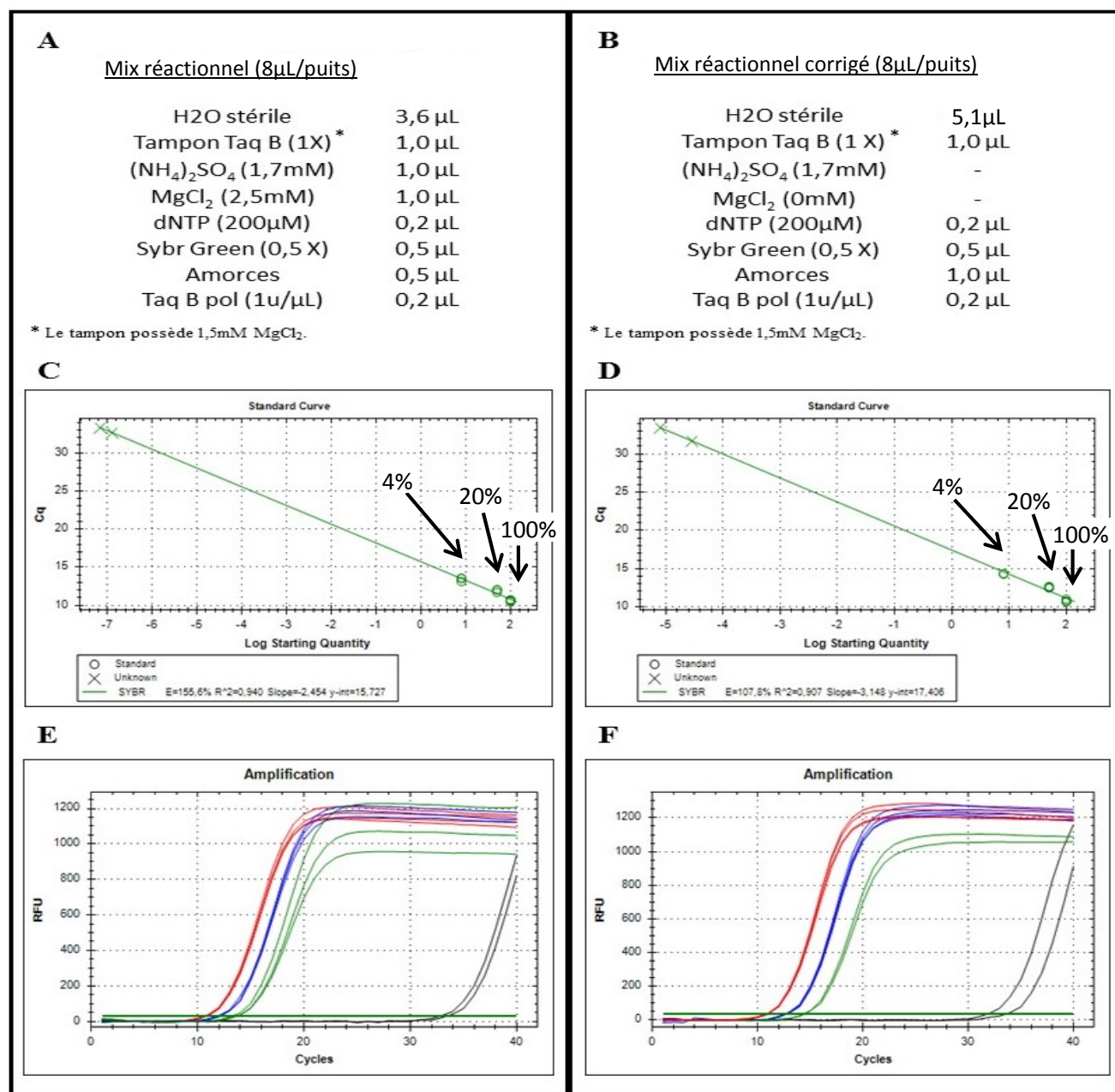
**Figure 4.3 (A-B) L'effet du tampon NIB et (C-D) du traitement à la Protéinase K sur la qualité d'échantillons et la quantification de l'ADN sb par QAOS.** Comparaison entre les résultats de % simple brin pour le locus Y'600 obtenus suite à l'extraction d'ADN avec le protocole d'extraction sans (A) et avec (B) l'omission du tampon NIB et avec (C) ou sans (D) traitement à la Protéinase K. Les souches à l'étude qui ont servi à la mise au point du QAOS sont les souches WT (MVY10), *cdc13-1* (MVY20) et *cdc13-1 rad9Δ* (MVY15).

température permissive, un % ADN sb de moins de 5% pour les contrôles type-sauvage incubé à toutes les conditions, une observation de différence statistiquement significative entre une incubation à une température permissive et non-permissive pour une souche possédant l'allèle *cdc13-1*, ainsi que des résultats qui ont une répétabilité. Au cours de mes nombreuses tentatives, j'ai conclu que la qualité de l'ADNg augmente lorsque le culot d'ADN n'est jamais vortexé et/ou resuspendu dans un milieu par pipette ou par vortex. Le traitement par Protéinase K a aussi nui à la qualité de l'ADNg. Les résultats obtenus sont présentés à la figure 4.3 (C-D). La mise au point du QAOS a été faite avec des souches (WT, *cdc13-1*, *cdc13-1 rad9Δ*) qui ont été bien caractérisées et ont été fournies par mon directeur de recherche. Les souches ont été exposées à trois températures distinctes, 23°C, 32°C et 37°C. On s'attend à ce que le % simple

brin des cellules *cdc13-1* exposées à 37°C pendant 4 heures, soit plus élevées ou égales à celui à 32°C. De plus, on s'attend à ce que le % simple brin obtenu pour la souche *cdc13-1 rad9Δ* soit plus élevé que le contrôle *cdc13-1*. Lorsqu'on regarde le % simple brin dans la souche contrôle (WT) à 23°C dont l'ADNg a été extrait avec le protocole NIB où le tampon NIB a été remplacé avec le tampon de lyse, nous pouvons observer qu'il y a une très grande diminution dans le % de simple brin au loci Y'600 lorsque l'ADN n'est pas traité avec la protéinase K (figure 4.3C-D). Bien que le niveau de % ADN sb pour la souche WT à 23°C soit toujours élevé, néanmoins il y a eu une majeure amélioration. De plus, à des températures restrictives de 32°C et 37°C, l'ADN non traité avec la Protéinase K (Figure 4.3D) et extrait avec le protocole NIB avec l'omission du tampon NIB présente une meilleure différence dans le % simple brin que ceux obtenus avec l'ADN traité avec la Protéinase K (Figure 4.3C). Plusieurs autres changements ont été apportés au protocole afin d'améliorer davantage la qualité et le rendement de l'ADNg extrait, comme utiliser un tampon de lyse contenant du Triton et SDS et de minimiser le nombre de fois que je fais un traitement au phénol/chloroforme. Mes observations m'ont suscité à essayer le protocole d'extraction proposé par Dewar et Lydall (2012). En effet, plusieurs de mes observations faites lors de la mise au point du protocole d'extraction NIB ont été respectés dans ce protocole. Ce protocole m'a permis d'avoir un meilleur rendement, grâce à la précipitation de l'ADNg avec l'acétate de sodium. Dans le protocole original de Dewar et Lydall (2012), suite à un premier traitement au phénol/chloroforme, un deuxième traitement s'en suit dans un tube «Phase lock Gel light». Ce tube permet une meilleure séparation de la phase aqueuse de la phase protéique et organique, ainsi de minimiser la contamination et d'optimiser la pureté de l'échantillon. Je n'ai pas inclus cette étape dans le protocole d'extraction que j'ai utilisé pour extraire mes échantillons. Le protocole décrit dans la section 4.1.1 *Extraction et purification de l'ADN génomique* qui est issu de celui de Dewar et Lydall (2012) est une méthode d'extraction simple, qui m'a permis d'obtenir la meilleure qualité et rendement d'ADNg.

Lors de la mise au point de la technique QAOS, la seconde épreuve a été de trouver les conditions favorables pour obtenir une efficacité d'environ 100% avec un facteur de corrélation ( $R^2$ ) acceptable pour la courbe standard. Une efficacité de 100% signifie que le produit obtenu à l'étape 1 du QAOS (figure 4.2A) a été amplifié une fois après chaque cycle, donc à chaque cycle la quantité d'ADN double. Par exemple, une efficacité de 200% signifie que la quantité d'ADN, après un cycle, a quadruplé. Une bonne efficacité se situe entre 95 et 110%. La figure 4.4 présente les résultats d'efficacité et de  $R^2$  obtenus lorsque j'ai utilisé l'ancien mélange réactionnel (figure 4.4A) et celui corrigé (figure 4.4B) dans la quantification de l'ADN sb au locus Y'600. L'expérience a été faite avec des standards où la quantité d'ADN total par puits est de 20ng en suivant la méthode de préparation décrite dans la section 4.1.3 *Préparation des microplaques à 96 puits*. Nous observons dans la figure 4.4C qu'avec l'ancien mélange réactionnel (figure 4.4A) l'efficacité est de 155,6%. Initialement, j'ai préparé mes standards en diluant de l'ADN dénaturé dans de l'eau stérile, mais on s'est rendu compte, avec mes échantillons, que cette méthode ne permettait pas d'obtenir le % de simple brin, mais la quantification de l'ADNg. Ceci a été déduit par nos observations qu'il n'existait aucune différence entre le % ADN sb obtenu pour la souche *cdc13-1* à 23°C et celui à 32°C. Or, selon la littérature et les résultats de la technique d'hybridation non dénaturante obtenus dans cette étude, nous savions qu'une différence statistiquement significative existe entre ces deux conditions dans la souche *cdc13-1*. Alors, nous avons conclu que nous devons utiliser un standard dont l'ADN dénaturé est dilué dans de l'ADN natif, ce qui est aussi la bonne manière de faire l'expérience. Dans le papier de Holstein *et al.* (2012), j'avais observé qu'ils n'utilisaient pas de sulfate d'ammonium  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  et il n'y avait aucun ajout de chlorure de magnésium ( $\text{MgCl}_2$ ) dans le mix réactionnel, puisque le  $\text{MgCl}_2$  était déjà présent dans le tampon.  $\text{MgCl}_2$  est un composé ionique qui permet de fournir le magnésium, qui joue le rôle de cofacteur nécessaire pour l'activité de la polymérase. Une concentration élevée en magnésium peut augmenter l'activité de la polymérase, ce qui n'est pas favorable dans une expérience de qPCR. Suite à ses observations, j'ai décidé de tester si un mélange réactionnel sans  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  et sans l'ajout additionnel de  $\text{MgCl}_2$  permettait d'obtenir une efficacité d'environ 100%. Suite à ses

changements et en utilisant une bonne qualité d'ADNg, j'ai pu obtenir une efficacité de 107,8% (Figure 4.4D).

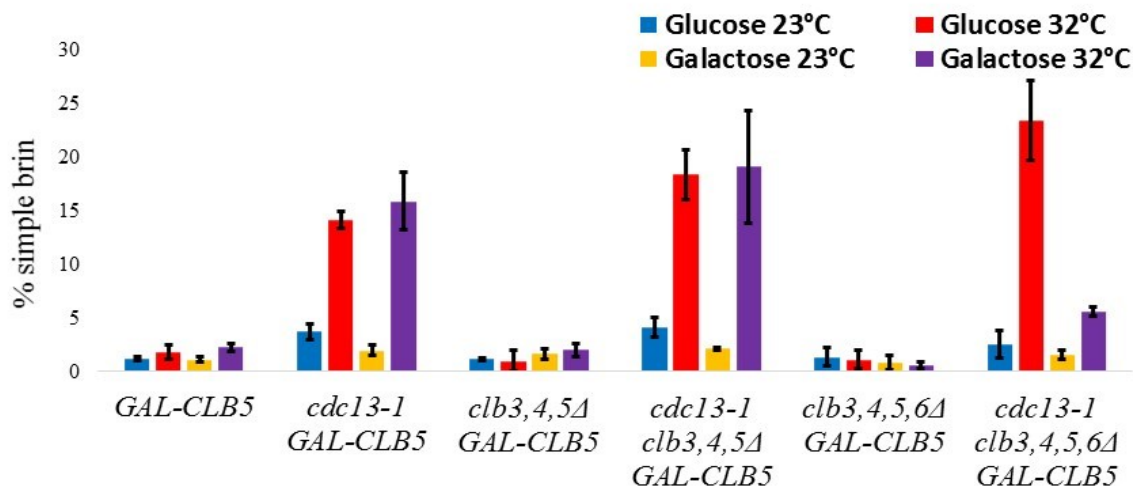


**Figure 4.4 Effet de la correction du mélange réactionnel sur l'efficacité de l'expérience QAOS.** Comparaison des résultats obtenus pour le locus Y'600 obtenus suite à la correction du mélange réactionnel (A) en comparaison avec l'ancien mélange (B) sur l'efficacité avec (C) et sans (D) la correction. Les courbes de standard 100% (en rouge), 20% (en bleu), 4% (en vert) d'ADNg dénaturé et le contrôle négatif (en noir) obtenus avec (E) et sans (F) la correction du mélange réactionnel en utilisant la souche WT (YE46) arrêtée en G1 dans la mise au point du QAOS.

L'ajout de 2,5mM  $MgCl_2$ , sans l'ajout du sulfate d'ammonium à la réaction à un très mauvais effet, car l'efficacité augmente dans les 300% et plus (données non montrées). Selon mes observations, l'ajout de sulfate d'ammonium permet en quelque sorte de renverser l'effet du surplus de  $MgCl_2$ , mais ne permet pas de rétablir l'activité habituelle de la polymérase. Ainsi le  $MgCl_2$  fournie dans le tampon est suffisant pour l'activité de la polymérase. Ainsi, aucune mise au point additionnelle n'était besoin, car le problème venait d'une erreur de calcul, qui avait conduit à l'ajout de sulfate d'ammonium. D'autres erreurs se sont introduites dans le mix réactionnel. En effet, la concentration finale d'amorce était en réalité la moitié de celui établi par l'équipe de Lydall. Ainsi, cette correction m'a aussi permis d'obtenir une bonne efficacité.

Durant mes travaux de maîtrise, j'ai eu l'occasion de tester la technique de QAOS corrigée avec les souches *GAL-CLB5* contenant des délétions de cyclines de la phase S. La figure 4.5 présente le % simple brin mesuré au locus Y'5000 (figure 4.5). Le % simple brin présent au niveau de la région sous-télomérique Y'5000 est moindre de 5% dans une souche type sauvage ayant la construction *GAL-CLB5* exposée à une température ambiante pendant 4 heures. Il est ainsi possible de distinguer une augmentation de la quantité du simple brin. Plus haut, il avait été mentionné que l'utilisation du fluorophore SYBR Green pouvait conduire à une augmentation dans le bruit de fond. Cependant, les résultats obtenus pour le contrôle par l'équipe de Booth et Lydall (2001) pendant une incubation de 2 heures sont également inférieurs à 5% et sont semblables à mes résultats. Ainsi, dans cette étude, j'ai pu montrer que le SYBR Green permet, tout comme la chimie Taqman avec l'amorce probe, d'obtenir une bonne détection et quantification de l'ADN simple brin.





**Figure 4.5 Quantification du % simple brin par QAOS.** Des cultures asynchrones des souches de levures *GAL-CLB5* (YE3552 et YE3553), *cdc13-1 GAL-CLB5* (MKY9 et MKY10), *clb3,4,5Δ GAL-CLB5* (YE3665 et YE3666), *cdc13-1 clb3,4,5Δ GAL-CLB5* (YE3665 et YE3666), *clb3,4,5,6Δ GAL-CLB5* (MVY622) et *cdc13-1 clb3,4,5,6Δ GAL-CLB5* (YE3644 et MVY627) ont été incubées pendant 4 heures en présence d'un milieu possédant du glucose ou du galactose à une température de 23°C ou 32°C. Le % simple brin ont été mesuré par qPCR au locus Y'5000.

Le % simple brin mesuré à Y'5000 permet de confirmer que la résection aux télomères déprotégés est rendue jusqu'aux régions sous-télomériques. En effet, dans les souches ayant l'allèle *cdc13-1*, nous observons qu'il existe une différence statistiquement significative entre le % simple brin mesuré à une température permissive contre non-permissive (figure 4.5). De plus, sauf pour la souche *cdc13-1 clb3,4,5,6Δ GAL-CLB5*, le % simple brin est semblable entre la souche qui surexprime le CLB5 et celle dont la protéine a été complètement dégradée (figure 4.5A). Ces résultats signifient que le niveau de la résection est semblable entre *cdc13-1 clb3,4Δ GAL-CLB5* (correspond à la souche *cdc13-1 clb3,4,5Δ GAL-CLB5* incubée dans du galactose) et *cdc13-1 clb3,4,5Δ GAL-CLB5*, ainsi suggérant que la délétion d'une troisième cycline de la phase S ne permet pas de renverser l'effet de *cdc13-1* à une température restrictive. Ces résultats concordent aussi avec ceux obtenus par l'hybridation non dénaturante. En effet, dans les mutants ayant une triple délétion des cyclines de la phase S, aucune réversibilité de la

résection n'a été observée. Ce qui est difficile à expliquer est le % simple brin obtenu par une souche *cdc13-1 clb3,4,5,6Δ GAL-CLB5* à 32°C (figure 4.5). Bien que la souche *cdc13-1 clb3,4,6Δ GAL-CLB5* (correspond à la souche *cdc13-1 clb3,4,5,6Δ GAL-CLB5* incubée dans du galactose) présente un % simple élevé à 32°C, dans les deux clones testés le niveau de simple brin est moindre lorsque le CLB5 est surexprimé (figure 4.5). Une possibilité est que la résection qui a conduit à la formation d'une extension simple brin a été reconverti en ADN double brin. En effet, dans une étude sur la cinétique de la résection des souches *cdc13-1* au locus YER186C du chromosome V-R (figure 4.2B), Booth et Lydall (2001) ont observé que le niveau d'ADN simple brin des mutants *cdc13-1 rad9Δ* et *cdc13-1 RAD9* avaient augmenté et diminué dans le temps. Ainsi, afin de confirmer que la perte de simple brin est due au fait qu'il a été reconverti en ADN double brin, je devrais faire une étude cinétique avec la souche *cdc13-1 clb3,4,5,6Δ GAL-CLB5*.

Bien que nous observions des différences statistiquement significatives entre les différentes conditions, il faut prendre en considération que ces résultats proviennent de seulement une expérience et il faut faire au moins deux autres expériences indépendantes avant de pouvoir confirmer nos conclusions.

#### 4.4 CONCLUSION

En conclusion, la technique de QAOS permet de quantifier le simple brin et de suivre la résection à l'aide de différentes paires d'amorces qui sont spécifiques pour un locus donné. Bien que la technique d'hybridation non dénaturante soit simple et très utilisée, elle ne permet pas de démontrer si la résection est rendue au delà des répétitions télomériques dans une souche de levure donnée qu'une autre à cause de ses limites. Ainsi, le QAOS pourrait être un outil à envisager afin de répondre à cette question. En utilisant la qPCR, comme moyen de

quantification, et le SYBR Green, comme moyen de détection, j'ai pu mettre au point le QAOS. J'ai également pu démontrer qu'aucun ajout de réactifs, comme le sulfate d'ammonium, n'est nécessaire pour le bon fonctionnement de la technique. J'ai également pu démontrer que le protocole d'extraction d'ADN génomique de Dewar et Lydall (2012) permet d'obtenir un ADN de qualité, essentielle pour obtenir une bonne efficacité. Finalement, cette technique pourra être envisagée afin de répondre aux questions dont les limites d'interprétation de la technique d'hybridation non dénaturante ne le permettent pas.

## RÉFÉRENCE

- Booth C., Griffith E., Brady G., Lydall D. (2001). Quantative amplification of single-stranded DNA (QAOS) demonstrates that *cdc13-1* mutants generate ssDNA in a telomere to centromere direction. *Nucleic Acids Res.* 29, 4414-22.
- Dewar J.M., Lydall D. (2012). Simple, non-radioactive measurement of single-stranded DNA at telomeric, sub-telomeric, and genomic loci in budding yeast. *DNA Repair Protocols, Methods in Molecular Biology* 920, 341-348
- Dionne I., Wellinger R.J. (1996). Cell cycle-regulated generation of single-stranded G-rich DNA in the absence of telomerase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 93, 13902-07.
- Foster S.S., Zubko M.K., Guillard S., Lydall D. (2006). MRX protects telomeric DNA at uncapped telomeres of budding yeast *cdc13-1* mutants. *DNA Repair* 5, 840-851.
- Frankfurt O.S., Robb J.A., Sugarbaker E.V., Villa L. (1996). Monoclonal antibody to single-stranded DNA is a specific and sensitive cellular marker of apoptosis. *Exp. Cell Res.* 226, 387-97.
- Gravel S., Larrivee M., Labrecque P., Wellinger R.J. (1998). Yeast Ku as a regulator of chromosomal DNA end structure. *Science* 280, 741-44.
- Garvik B., Carson M., Hartwell L. (1995). Single-stranded DNA arising at telomeres in *cdc13* mutants may constitute a specific signal for the RAD9 checkpoint. *Mol. Cell. Biol.* 15, 6128-38.

- Henson P. (1978). The presence of single-stranded regions in mammalian DNA. *J. Mol. Biol.* 119, 487-506
- Holstein E.M., Lydall D. (2012). Chapter 23: Quantitative amplification of single-stranded DNA. *DNA Repair Protocols* 920, 323-39.
- Johnson, L. (2009). Diagnostic Parasitology. Clinical Laboratory Sciences, Idaho State University, USA. (<http://www.isu.edu/mls/shields09wikis/parasitology.html>)
- Lydall D., Weinert T. (1995). Yeast checkpoint genes in DNA damage processing: implications for repair and arrest. *Science* 270, 1488-91.
- Lydall D., Weinert T. (1996). From DNA damage to cell cycle arrest and suicide: a budding yeast perspective. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 6, 4-11.
- Lydall D., Weinert T. (1997). Use of cdc13-1-induced DNA damage to study effects of checkpoint genes on DNA damage processing. *Methods Enzymol.* 283, 410-24.
- Makarov V.L., Hirose Y., Langmore J.P. (1997). Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening. *Cell* 88, 657-66.
- Okazaki R., Okazaki T., Sakabe K., Sugimoto K., Sugino A. (1968). Mechanism of DNA chain growth. I. Possible discontinuity and unusual secondary structure of newly synthesized chains. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 59, 598-605.
- Polotnianska R.M., Li J., Lustig A.J. (1998). The yeast Ku heterodimer is essential for protection of the telomere against nucleolytic and recombinational activities. *Curr. Biol.* 8, 831-34.
- Raderschall E., Golub E.I., Haaf T. (1999). Nuclear foci of mammalian recombination proteins are located at single-stranded DNA regions formed after DNA damage. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96, 1921-26.
- Sugawara N., Haber J.E. (1992). Characterization of double-strand break-induced recombination: homology requirements and single-stranded DNA formation. *Mol. Cell. Biol.* 12, 563-75.
- Sun H., Treco D., Szostak J.W. (1991). Extensive 3'-overhanging, single-stranded DNA associated with the meiosis-specific double-strand breaks at the ARG4 recombination initiation site. *Cell* 64, 1155-61.

- Tapiero H., Leibowitch S.A., Shaool D., Monier M.N., Harel J. (1976). Isolation of single stranded DNA related to the transcriptional activity of animal cells. *Nucleic Acids Res.* 3, 953-63.
- Wanka F., Brouns R.M., Aelen J.M., Eygensteyn A., Eygensteyn J. (1977). The origin of nascent single-stranded DNA extracted from mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 4, 2083-97.
- Watanabe T., Toyoda M., Okuda J., Tenjo T., Tanaka K., Yamamoto T., Kawasaki H., Sugiyama T., Kwarada Y., Tanigawa N. (1999). Detection of apoptotic cells in human colorectal cancer by two different *in situ* methods: antibody against single-stranded DNA and terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end-labeling (TUNEL) methods. *Jpn J. Cancer Res.* 90, 188-93.
- Zubko M.K., Maringele L., Foster S.S., Lydall D. (2006). Detecting repair intermediates in vivo : effects of DNA damage response genes on single-stranded DNA accumulation at uncapped telomeres in budding yeast. *Methods Enzymol.* 409, 285-300.

## CHAPITRE 5

### DISCUSSION

Au cours de la dernière décennie, des évidences ont émergé que la kinase Cdc28 dispose d'une boîte à outils pour réguler la phosphorylation sélective de ses différents substrats. Les cyclines, les sous-unités de la Cdc28 qui activent la kinase, sont des outils clés dans ce sens puisqu'elles permettent la kinase de cibler ses substrats de façon différentielle. Les différentes cyclines non seulement augmentent graduellement l'activité de la kinase, mais possèdent de sites à fixation pour de substrats particuliers pour augmenter l'efficacité de phosphorylation et peuvent moduler la spécificité du site actif de la kinase de manière qu'elle reconnait des sites de phosphorylation non classiques (Kõivomägi et Loog, 2011). La régulation de la spécificité de Cdc28 vers leurs substrats apparemment pourrait avoir une grande importance pour l'exécution ordonnée des événements durant le cycle cellulaire. En support de ce point de vue, plusieurs études dans les dernières années ont démontré la phosphorylation sélective de protéines bien connue pour leurs rôles dans la progression du cycle cellulaire par un complexe spécifique cycline-Cdc28 chez la levure bourgeonnante (Loog et Morgan, 2005 ; Kõivomägi *et al.*, 2011 ; Bhaduri et Pryciak, 2011; Ear *et al.*, 2013 ; Li *et al.*, 2014 ; Pope *et al.*, 2014). Ainsi, pour l'instant, les études sur la phosphorylation sélective de cibles de la kinase Cdc28 conférée par l'appariement avec différentes sous-unités de cyclines suggèrent qu'une telle sélectivité soit importante pour la fonction classique de Cdc28 dans la régulation du cycle cellulaire. Par contre, si les cyclines modulent de la même manière la spécificité de la kinase lors de l'exécution de ses fonctions non classiques, telles que l'altération des voies de réparation d'ADN ou l'activation de la DDR, n'a pas été examinée. Ainsi, dans le cadre de mon projet de maîtrise, nous avons étudié la spécificité des complexes Clb-Cdc28 au niveau de la résection des télomères en utilisant la levure bourgeonnante *Saccharomyces cerevisiae* comme modèle.

Une des fonctions non classiques de la kinase Cdc28 est la formation et la maintenance des extensions 3' aux télomères. Nos études antérieures ont démontré que des complexes Clb-Cdc28 sont impliqués dans la formation des extensions 3' et la structure terminale des chromosomes, ainsi que la résection non contrôlée lorsque les télomères sont déprotégés (Vodenicharov et Wellinger, 2006). Dans la présente étude, nous avons commencé l'analyse systématique des délétions des six cyclines de type B pour pouvoir déterminer leur effet sur la résection des télomères déprotégés. Deux groupes de mutants, portant des délétions de cyclines précoces et de toutes les cyclines de la phase S, combinés avec l'allèle thermosensible *cdc13-1*, qui permet la déprotection des télomères (ou l'allèle de type sauvage *CDC13* comme contrôle), ont été caractérisés. La déprotection des télomères dans les cellules *cdc13-1* à une température élevée entraîne la dégradation des télomères accompagnée d'une accumulation de l'ADN sb qui induit l'arrêt du cycle cellulaire et la mort cellulaire. À des températures semi-permissives, les cellules *cdc13-1* sont capables de survivre et se diviser, malgré que leur aptitude de croissance soit fortement diminuée. D'abord, nous avons analysé les paramètres de croissance de nos mutantes dans le but de déterminer si une ou plusieurs délétions des cyclines pourront rétablir la croissance des cellules *cdc13-1* à une température semi-permissive. Contrairement aux attentes, certaines des doubles délétions et surtout les triples délétions de cyclines de la phase S en combinaison avec *cdc13-1* ont grandement diminué l'aptitude de croissance des cellules *cdc13-1*. En particulier, les souches contenant les doubles délétions *clb5,6Δ* (figures 3.1B et D), *clb3,5Δ* ou *clb3,6Δ* (figure 3.6A et B) manifestent une thermosensibilité accrue à une température semi-permissive. L'aptitude de croissance de toutes les triples délétions en combinaison avec l'allèle *cdc13-1* est encore plus affectée (figure 3.7A et B). Cet effet est spécifique pour les souches portant l'allèle *cdc13-1*, puisqu'il n'était pas observé pour les souches contrôles portant seulement les délétions de cyclines. L'aptitude de croissance des souches triple-mutant à 28°C est réduite jusqu'à 10 fois en comparaison avec la souche contenant la même combinaison de trois délétions de gènes de cyclines, mais ayant l'allèle sauvage de *CDC13* (figure 3.7B). Ce n'est pas uniquement un effet de l'inactivation de Cdc13 parce que dans une souche contrôle *cdc13-1*, exposé à la même température, on observe une réduction seulement de 30-40% de l'aptitude de croissance par rapport d'une souche de type

sauvage (figure 3.7B). Par contre, la quantification de la résection dans ces souches ne montre pas une hausse marquante de l'ADN sb aux télomères, suggérant que cette réduction sévère de la croissance ne soit pas causée par une dégradation accrue des télomères (figure 3.7C). Une possibilité est que des limitations techniques au niveau de la quantification de l'ADN sb aux télomères par l'hybridation non dénaturante, discutée dans la section Résultats, sont à la base de ces résultats. D'abord, il serait envisageable de tester, dans ces souches, pour la présence de l'ADN sb dans des régions distales par rapport des télomères en utilisant des approches permettant la détection d'ADN sb au long des bras des chromosomes, par exemple la technique QAOS. Cependant, la différence majeure observée dans la croissance des souches combinant la délétion des cyclines avec l'allèle *cdc13-1* et celle des contrôles *cdc13-1* ne nous laisse pas croire vraiment que seule la résection plus profonde en soit responsable. De plus, si une telle dégradation excessive s'était passée dans ces cellules, mais, pour de raisons techniques, n'a pas été détectée, ceci va vouloir dire que les cyclines de la phase S protègent les télomères contre la dégradation, ce qui ne s'accorde pas aisément avec un rôle direct de la Clb-Cdc28 dans la résection.

Le défaut de croissance des triples mutants pourrait s'expliquer avec une interaction synergique, entre la fonction compromise de la protéine Cdc13 et les délétions des cyclines, mais indépendante de la résection aux télomères déprotégés. Dans ce scénario, la perte combinée des cyclines et la fonction de la protéine Cdc13 pourraient avoir un effet cumulatif fortement nuisible sur la réplication d'ADN. Les cyclines précoces de la phase S, Clb5 et Clb6, sont connues pour son rôle dans l'initiation de la réplication (Epstein et Cross, 1992 ; Kuhnelt et Linder, 1993 ; Schwob et Nasmyth, 1993). De plus, la paire de cyclines Clb3/4 semble jouer un rôle complémentaire aux cyclines précoces Clb5/6 dans la progression de la réplication d'ADN, ainsi que promouvoir la transition S-G2 du cycle cellulaire (Fitch *et al.*, 1992 ; Richardson *et al.*, 1992 ; Schwob et Nasmyth, 1993). D'ailleurs, il a été proposé que le complexe CST et la protéine Cdc13 joueraient un rôle important pour la réplication des télomères chez différentes espèces de levure, y compris *S. cerevisiae* (Gao *et al.*, 2007 ; Sun J *et al.*, 2009 ; Gelinas *et al.*,



2009 ; Paschini *et al.*, 2010). De plus, les homologues des membres du complexe CST chez les eucaryotes supérieurs ont été impliqués dans la réplication générale du génome (Dewar et Lydall, 2012 et les références là-dedans). Les résultats présentés ici démontrent que la délétion des gènes des cyclines S conduit à une réduction supplémentaire de la croissance des cellules *cdc13-1* qui n'est pas nécessairement liée à l'accumulation plus importante d'ADN sb aux télomères (figures 3.1B et D, 3.6A et B, 3.7A, B et C). Sachant que la délétion de multiples cyclines affecterait négativement la réplication d'ADN durant la phase S, la croissance réduite des cellules peut être expliquée par le ralentissement des fourches de réplication et l'accumulation de structures aberrantes qui demandent l'activation des mécanismes de réparation d'ADN. Lorsque la fonction de la protéine Cdc13 est compromise partiellement à 28°C, les télomères deviennent probablement un obstacle encore plus important pour la réplication. La difficulté de la fourche répliquative de traverser les régions télomériques a été documentée chez différentes espèces de levure (Ivessa *et al.*, 2002 ; Miller *et al.*, 2006). Les problèmes de réplication déjà présents dans les mutantes de cyclines sont probablement renforcés par l'inactivation partielle de la fonction de Cdc13, ainsi activant la DDR et freinant la croissance. Cette hypothèse est soutenue par nos analyses de l'activation de la protéine Rad53 qui semble plus fortement phosphorylée dans les souches *cdc13-1* avec triple délétion de cyclines que dans la souche contrôle *cdc13-1*, et ce, notamment, à température de 28°C, mais pas à 23°C (figure 3.8A).

Un tel effet négatif additif sur la croissance a été noté également quand mutations d'autres protéines faisant partie de la machinerie de réplication étaient combinées à l'inactivation de la protéine Cdc13. Par exemple, le complexe Mrc1-Tof1-Psy2 est un complexe qui aide à la progression de la fourche de réplication et régule le point de contrôle répliquatif en présence de dommages à l'ADN durant la phase S (Alsacabas *et al.*, 2001 ; Osborn et Elledge, 2003 ; Katou *et al.*, 2003). De manière similaire aux cellules ayant des délétions de cyclines, la progression des cellules en phase S est ralentie dans les mutants *mrc1*. Le complexe Mrc1-Tof1-Psy2 semble supporter la viabilité des cellules ayant de télomères déprotégés puisque la délétion d'un de ses

membres conduit à une croissance réduite et à la diminution de la température permissive des mutants *cdc13-1* (Grandin et Charbonneau, 2007 ; Tsolou et Lydall, 2007). Peut-être, quand les protéines de la coiffe ne sont plus en mesure de supporter la machinerie répliquative, des structures aberrantes s'accumulent plus rapidement et persistent plus longtemps aux télomères, lorsque l'activation de la DDR est aussi défectueuse en absence de Mrc1. Ces effets ressemblent à nos observations que la délétion de cyclines importantes pour la réplication de l'ADN a une influence négative sur la croissance des cellules lorsque leurs télomères sont partiellement décoiffés. Prenant en considération ces données, l'interaction synergique sur la croissance observée dans nos expériences n'est pas surprenante, malgré que la cause sous-jacente de cette interaction n'ait pas été analysée. Par exemple, nous pourrions envisager qu'une fonction abortive de CST lors de la réplication des télomères pourrait aggraver les conséquences du délai d'activation des origines de réplication tardives en absence de Clb5 (Donaldson *et al.*, 1998).

Par ailleurs, à une température non-permissive de 32°C, toutes les souches contenant l'allèle *cdc13-1* combiné avec différentes triples délétions de cyclines se comportent comme le contrôle *cdc13-1*, ainsi indiquant que la perte de viabilité due à la dégradation des télomères n'est pas supprimée par la délétion de ces cyclines (voir la figure 3.7A et C). De plus, les résultats de la quantification d'ADN sb indiquent qu'aucune des triples délétions ne supprime l'effet de l'allèle thermosensible sur la résection ni sur l'activation de la DDR tel qu'évalue par la présence de formes phosphorylées de Rad53. Par la suite, les analyses se sont poursuivies avec la quadruple délétion de toutes les cyclines de la phase S. Pour ce faire, nous avons utilisé l'expression conditionnelle du gène *CLB5* comme moyen de maintenir la viabilité des cellules, puisque la délétion de toutes les quatre cyclines de la phase S est létale (Epstein et Cross, 1992 ; Schwob et Nasmyth, 1993). Lors des expériences préliminaires, un excellent contrôle sur l'expression du gène *CLB5* a pu être observé (figure 3.10) et les tests d'inhibition de croissance ont démontré de façon non ambiguë que les cellules soient dépourvues des cyclines de la phase S sous les conditions établies (figure 3.11 et 3.12B). L'évaluation de la résection aux télomères montre que le quadruple délétion de toutes les cyclines de la phase S ne suffit pas pour supprimer

la dégradation des télomères déprotégés (figure 3.12A). De plus, les analyses préliminaires par la technique QAOS aux loci distaux du télomère V-R suggèrent que la dynamique de résection n'a pas été affectée en absence de ces quatre cyclines. Ce résultat a été aussi confirmé dans une expérience indépendante avec des cellules bloquées en G2/M pour exclure des influences de la division ou la réplication sur la résection. Ainsi, le taux de résection était non changé par l'absence de l'ensemble de cyclines de la phase S.

La découverte que la délétion de quatre sous-unités de cyclines n'affecte pas la résection des télomères décoiffés contraste les observations faites auparavant par l'inhibition de l'activité de Cdc28. La surexpression de l'inhibiteur Sic1 des complexes Clb-Cdc28 supprime complètement la résection aux télomères déprotégés (Vodenicharov et Wellinger, 2006). À la base de nos observations antérieures, il a été proposé que l'activité de la kinase Cdc28 en complexe avec les cyclines de la phase S (ou S-Cdk1) est nécessaire pour la dégradation du brin C-riche aux télomères (Vodenicharov et Wellinger, 2006). L'approche expérimentale utilisée dans cette dernière étude, en fait, ne permettait pas d'évaluer la contribution des complexes individuels de cyclines-Cdc28 dans la résection. La réponse des cellules suite à la déprotection des télomères a été examinée en fonction d'une inhibition totale de l'activité Clb-Cdc28, puisque la protéine Sic1 est une inhibitrice polyvalente des complexes de la Cdc28 avec les cyclines de type B (Mendenhall, 1993 ; Schwob *et al.*, 1994 ; Donovan *et al.*, 1994). Les résultats présentés ici ne supportent pas la conclusion que la S-Cdc28 est responsable pour la résection aux télomères, mais suggèrent plutôt que la kinase Cdc28 collabore avec les cyclines mitotiques pour accomplir cette fonction. L'analyse systématique des délétions des cyclines de type B réalisée dans cette étude démontre qu'en absence des S cyclines la résection n'a pas été affectée dans les cellules en division ou arrêtées en G2/M (figures 3.12 et 3.13), probablement parce que les cyclines mitotiques sont toujours disponibles pour activer la Cdc28. En revanche, l'expression de la protéine inhibitrice Sic1 dans des cellules arrêtées en G2/M conduit à une suppression quasi-complète de la résection (Vodenicharov et Wellinger, 2006). Étant donné qu'en G2/M, et en absence d'autres cyclines Clb, les cyclines mitotiques modulent l'activité de

Cdc28, nos résultats suggèrent fortement que l'activité de M-Cdc28 est impliquée dans le processus de dégradation des télomères déprotégés.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Mes travaux de maîtrise ont permis d'éliminer le rôle des cyclines de la phase S dans cette résection puisque la délétion de toutes les cyclines de la phase S ne permet pas de renverser l'effet de *cdc13-1* à une température non-permissive. Prise ensemble, mes résultats suggèrent qu'il est fort probable que ce sont les cyclines de la phase M qui sont impliquées dans ce processus.

Il serait donc intéressant de confirmer à l'avenir leur rôle dans la résection aux télomères déprotégés. Il est à noter qu'au niveau des CDB, dont la résection et la réparation par RH dépendent également de Cdc28, l'activité de Cdc28 est suffisante pour supporter la résection dans les cellules passées au-delà du point de départ START du cycle cellulaire, mais n'ont pas encore initiées la réplication (Ira *et al.*, 2004). Par contre, dans une situation similaire, où les cellules sont arrêtées tout au début de la phase S, on n'observe pas de résection aux télomères (Vodenicharov et Wellinger, 2006). Il serait d'abord intéressant d'analyser en plus détails le mécanisme derrière cette différence pour déterminer pourquoi les cyclines de la phase S ont la capacité de supporter la résection aux CDB, mais pas aux télomères déprotégés.

Il a été montré que Cdc28 régule des activités nucléases responsables pour l'initiation, ainsi que pour la résection profonde aux CDB. Les nucléases activées par phosphorylation doivent, une fois que leur mission est accomplie, être désactivées pour limiter la dégradation et l'activation persistante de la DDR. Dans ce sens, les mécanismes agissant de manière antagoniste à la

fonction activatrice de Cdc28 représentent aussi un sujet intéressant pour de futures études. Un tel mécanisme envisageable pourrait se baser sur le rétablissement de l'état initial de l'agent de résection par l'action de phosphatases spécifiques. Par contre, il est possible aussi que la DDR elle-même exerce une fonction de régulateur négatif sur les activités de résection, tel qu'était montré pour l'exonucléase Exo1 (Morin *et al.*, 2008).

Finalement, il serait intéressant d'identifier les cibles de Cdc28 dans le processus de résection et les cyclines qui collaborent avec la kinase dans la modification et l'activation de ces cibles. En perspective, ces études doivent ajouter aux connaissances acquises à ce jour sur la résection des télomères déprotégés, mais aussi promettent de dévoiler les particularités des télomères natifs versus les modèles des CDB et des néotélomères induits au niveau de reconnaissance et d'intervention des mécanismes de réparation.

## BIBLIOGRAPHIE

- Adams A.K., Holm C. (1996). Specific DNA replication mutations affect telomere length in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* *16*, 4614-20.
- Adams Martin A., Dionne I., Wellinger R.J., Holm C. (2000). The function of DNA polymerase alpha at telomeric G tails is important for telomere homeostasis. *Mol. Cell Biol.* *20*, 786-96.
- Addinall S.G., Holstein E.M., Lawless C., Yu M., Chapman K., Banks A.P., Ngo H.P., Maringele L., Taschuk M., Young A., Ciesiolka A., Lister A.L., Wipat A., Wilkinson D.J., Lydall D. (2011). Quantitative fitness analysis shows that NMD proteins and many other protein complexes suppress or enhance distinct telomere cap defects. *PLoS Genet.* *7*, e1001362.
- Agarwal R., Tang Z., Yu H., Cohen-Fix O. (2003). Two distinct pathways for inhibiting pds1 ubiquitination in response to DNA damage. *J. Biol. Chem.* *278*, 45027-33.
- Alberghina L., Rossi R.L., Querin L., Wanke V., Vanoni M. (2004). A cell sizer network involving Cln3 and Far1 controls entrance into S phase in the mitotic cycle of budding yeast. *J Cell Biol.* *167*, 433-443.
- Albert I., Mavrich T.N., Tomsho L.P., Qi J., Zanton S.J., Schuster S.C., Pugh B.F. (2007). Translational and rotational settings of H2A.Z nucleosomes across the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* *446*, 572-6.
- Alcasabass A.A., Osborn A.J., Bachant J., Hu F., Werler P.J., Bousset K., Furuya K., Diffley J.F., Carr A.M., Elledge S.J. (2001). Mrc1 transduces signals of DNA replication stress to activate Rad53. *Nat. Cell Biol.* *3*, 958-65.
- Alexander M.K., Zakian V.A. (2003). Rap1 telomere association is not required for mitotic stability of a C(3)TA(2) telomere in yeast. *EMBO J.* *22*, 1688-96.
- Amerić M., Linger J. (2007). Tel1 kinase and subtelomere-bound Tbf1 mediate preferential elongation of short telomeres by telomerase in yeast. *EMBO Rep.* *8*, 1080-5.
- Amon A., Irniger S., Nasmyth K. (1994). Closing the cell cycle circle in yeast: G2 cyclin proteolysis initiated at mitosis persists until the activation of G1 cyclins in the next cycle. *Cell* *77*, 1037-1050.

- Amon A., Tyers M., Futcher B., Nasmyth K. (1993). Mechanisms that help the yeast cell cycle clock tick: G2 cyclins transcriptionally activate G2 cyclins and repress G1 cyclins. *Cell* 74, 993–1007.
- Anbalagan S., Bonetti D., Lucchini G., Longhese M.P. (2011). Rif1 supports the function of the CST complex in yeast telomere capping. *PLoS Genet.* 7, e1002024.
- Andrews B.J., Herskowitz I. (1989). Identification of a DNA binding factor involved in cell-cycle control of the yeast *HO* gene. *Cell* 57, 21–29.
- Andrews B.J., Moore L. (1992a). Mutational analysis of a DNA sequence involved in linking gene expression to the cell cycle. *Biochem. Cell Biol.* 70, 1073–1080.
- Andrews B.J., Moore L.A. (1992b). Interaction of the yeast Swi4 and Swi6 cell cycle regulatory proteins in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 11852–11856.
- Andrews B., Measday V. (1998). The cyclin family of budding yeast: abundant use of a good idea. *Trends Genet.* 14, 66–72.
- Anderson M.S., Lopes JM. (1996). Carbon source regulation of *PIS1* gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* involves the *MCM1* gene and the two-component regulatory gene, *SLN1*. *J. Biol. Chem.* 271, 26596–26601.
- Apone L.M., Virbasius C.M.A., Reese J.C., Green M.R. (1996). Yeast TAFII90 is required for cell-cycle progression through G2/M but not for general transcription activation. *Genes Dev.* 10, 2368–2380.
- Archambault V., Buchler N.E., Wilmes G.M., Jacobson M.D., Cross F.R. (2005). Twofaced cyclins with eyes on the targets. *Cell Cycle* 4, 125–130.
- Archambault V., Chang E.J., Drapkin B.J., Cross F.R., Chait B.T., Rout M.P. (2004). Targeted proteomic study of the cyclin-Cdk module. *Mol. Cell* 14, 699–711.
- Arellano M., Moreno S. (1997). Regulation of CDK/cyclin complexes during the cell cycle. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29, 559–573.
- Aristarkhov A., Eytan E., Moghe A., Admon A., Hershko A., Ruderman J.V. (1996). E2-C, a cyclin-selective ubiquitin carrier protein required for the destruction of mitotic cyclins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 4294–4299.
- Arndt K.T., Styles C.A., Fink G.R. (1989). A suppressor of a *HIS4* transcriptional defect encodes a protein with homology to the catalytic subunit of protein phosphatases. *Cell* 56, 527–537.

- Ashe M., de Bruin R.A., Kalashnikova T., McDonald W.H., Yates J.R. 3rd, Wittenberg C. (2008). The SBF- and MBF-associated protein Msa1 is required for proper timing of G1-specific transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 283, 6040-9.
- Arvai A.S., Bourne Y., Hickey M.J., Tainer J.A. (1995). Crystal structure of the human cell cycle protein CksHs1: single domain fold with similarity to kinase N-lobe domain. *J. Mol. Biol.* 249, 835–842.
- Atherton-Fessler S., Parker L.L., Geahlen R.L., Piwnicka-Worms H. (1993). Mechanisms of p34<sup>cdc2</sup> regulation. *Mol. Cell. Biol.* 13, 1675–1685.
- Aylon Y., Liefshitz B., Kupiec M. (2004). The CDK regulates repair of double-strand breaks by homologous recombination during the cell cycle. *EMBO J.* 23, 4868–75.
- Azzalin C.M., Lingner J. (2015). Telomere functions grounding on TERRA firma. *Trends Cell Biol.* 25, 29-36.
- Barlow J.H., Lisby M., Rothstein R. (2008). Differential regulation of the cellular response to DNA double-strand breaks in G1. *Mol Cell* 30, 73-85.
- Barlow J.H., Rothstein R. (2009). Rad52 recruitment is DNA replication independent and regulated by Cdc28 and the Mec1 kinase. *EMBO J.* 28, 1121-1130.
- Barzel A., Kupiec M. (2008). Finding a match: how do homologous sequences get together for recombination? *Nat. Rev. Genet.* 9, 27-37.
- Basco R.D., Segal M.D., Reed S.I. (1995). Negative regulation of G1 and G2 by S-phase cyclins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 15, 5030–5042.
- Bhaduri S., Pryciak P.M. (2011). Cyclin-specific docking motifs promote phosphorylation of yeast signaling proteins by G1/S Cdk complexes. *Curr. Biol.* 21, 1615-23.
- Bianchi A., Shore D. (2007a). Increased association of telomerase with short telomeres in yeast. *Genes Dev.* 21, 1726–1730.
- Blackburn E.H. (2001). Switching and signaling at the telomere. *Cell* 106, 661-73.
- Blankley R.T., Lydall D. (2004). A domain of Rad9 specifically required for activation of Chk1 in budding yeast. *J. Cell. Sci.* 117, 601-8.
- Blier P.R., Griffith A.J., Craft J., Hardin J.A. (1993). Binding of Ku protein to DNA. Measurement of affinity for ends and demonstration of binding to nicks. *J. Biol. Chem.* 268, 7594-601.



- Bloom J., Cross F.R. (2007). Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 149-160.
- Bodnar A.G., Ouellette, M., Frolkis M., Holt S.E., Chiu C.P., Morin G.B., Harley C.B., Shay J.W., Lichtsteiner S., Wright W.E. (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279, 349-352.
- Bonetti D., Anbalagan S., Lucchini G., Clerici M., Longhese M.P. (2013). Tbf1 and Vid22 promote resection and non-homologous end joining of DNA double-strand break ends. *EMBO J.* 32, 275-89.
- Bonetti D., Clerici M., Manfrini N., Lucchini G., Longhese M.P. (2010). The MRX complex plays multiple functions in resection of Yku- and Rif2-protected DNA ends. *PloS One* 5, e14142.
- Bonetti D., Martina M., Clerici M., Lucchini G., Longhese M.P. (2009). Multiple pathways regulate 3' overhang generation at *S. cerevisiae* telomeres. *Mol. Cell* 35, 70–81.
- Booher R.N., Alfa C.E., Hyams J.S., Beach D.H. (1989). The fission yeast cdc2/cdc13/suc1 protein kinase: regulation of catalytic activity and nuclear localization. *Cell* 58, 485–497.
- Booher R.N., Deshaies R.J., Kirschner M.W. (1993). Properties of *Saccharomyces cerevisiae* wee1 and its differential regulation of p34CDC28 in response to G1 and G2 cyclins. *EMBO J.* 12, 3417-26.
- Booth C., Griffith E., Brady G., Lydall D. (2001). Quantitative amplification of single-stranded DNA (QAOS) demonstrates that cdc13-1 mutants generate ssDNA in a telomere to centromere direction. *Nucleic Acids Res.* 29, 4414–22.
- Boulton S.J., Jackson S.P. (1996). Identification of a *Saccharomyces cerevisiae* Ku80 homologue: roles in DNA double strand break rejoining and in telomeric maintenance. *Nucleic Acids Res.* 24, 4639–48.
- Boulton S.J., Jackson S.P. (1998). Components of the Ku-dependent non-homologous end-joining pathway are involved in telomeric length maintenance and telomeric silencing. *EMBO J.* 17, 1819–28.
- Bourns B.D., Alexander M.K., Smith A.M., Zakian V.A. (1998). Sir proteins, Rif proteins, and Cdc13p bind *Saccharomyces* telomeres in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 18, 5600-8.
- Brachmann C.B., Davies A., Cost G.J., Caputo E., Li J., Hieter P., Boeke J.D. (1998). Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* 14, 115-32.

- Breeden L., Nasmyth K. (1987). Cell cycle control of the yeast *HO* gene: *cis*- and *trans*-acting factors. *Cell* 48, 389–397.
- Brigati C., Kurtz S., Balderes D., Vidali G., Shore D. (1993). An essential yeast gene encoding a TTAGGG repeat-binding protein. *Mol. Cell Biol.* 13, 1306-14.
- Buchman A.R., Lue N.F., Kornberg R.D. (1988). Connections between Transcriptional Activators, Silencers, and Telomeres as Revealed by Functional Analysis of a Yeast DNA-Binding Protein. *Mol. Cell. Biol.* 8, 5086–5099.
- Budd M.E., Reis C.C., Smith S., Myung L., Campbell J.L. (2006). Evidence suggesting that Pif1 helicase functions in DNA replication with the Dna2 helicase/nuclease and DNA polymerase delta. *Mol. Cell Biol.* 26, 2490-500.
- Cannavo E., Cejka P. (2014). Sae2 promotes dsDNA endonuclease activity within Mre11-Rad50-Xrs2 to resect DNA breaks. *Nature* 514, 122-5.
- Cannavo E., Cejka P., Kowalczykowski S.C. (2013). Relationship of DNA degradation by *Saccharomyces cerevisiae* exonuclease 1 and its stimulation by RPA and Mre11-Rad50-Xrs2 to DNA end resection. *Proc. Natl. Acad. USA* 110, e1661-8.
- Cejka P., Cannavo E., Polaczek P., Masuda-Sasa T., Pokharel S., Campbell J.L., Kowalczykowski S.C. (2010). DNA end resection by Dna2-Sgs1-RPA and its stimulation by Top3-Rmi1 and Mre11-Rad50-Xrs2. *Nature* 467, 112-6.
- Chan C.S., Tye B.K. (1983a). A family of *Saccharomyces cerevisiae* repetitive autonomously replicating sequences that have very similar genomic environments. *J. Mol Biol*, 168, 505–523.
- Chan C.S., TYE B.K. (1983b). Organization of DNA sequences and replication origins at yeast telomeres. *Cell* 33, 563–73.
- Chan S.W.L., Blackburn E.H. (2003). Telomerase and ATM/Tel1p protect telomeres from nonhomologous end joining. *Mol. Cell* 11, 1379–87.
- Chandra A., Hughes T.R., Nugent C.I., Lundblad V. (2001). Cdc13 both positively and negatively regulates telomere replication. *Genes Dev.* 15, 404-14.
- Charvin G., Cross F.R., Siggia E.D. (2009). Forced periodic expression of G1 cyclins phase-locks the budding yeast cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 6632-7.
- Charvin G., Oikonomou C., Siggia E.D., Cross F.R. (2010). Origin of irreversibility of cell cycle start in budding yeast. *PLoS One* 8, e1000284.

- Chen X., Niu H., Chung W.-H., Zhu Z., Papusha A., Shim E.Y., Lee S.E., Sung P., Ira G. (2011). Cell cycle regulation of DNA double-strand break end resection by Cdk1-dependent Dna2 phosphorylation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 1015–9.
- Churikov D., Corda Y., Luciano P., Géli V. (2013). Cdc13 at a crossroads of telomerase action. *Front. Oncol.* 3, 39.
- Cohen-Fix O., Koshland D. (1997). The anaphase inhibitor of *Saccharomyces cerevisiae* Pds1p is a target of the DNA damage checkpoint pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 14361–6.
- Conrad M.N., Wright J.H., Wolf A.J., Zakian V.A. (1990). RAP1 protein interacts with yeast telomeres in vivo: overproduction alters telomere structure and decreases chromosome stability. *Cell* 63, 739–50.
- Cosgrove A.J., Nieduszynski C.A., Donaldson A.D. (2002). Ku complex controls the replication time of DNA in telomere regions. *Genes Dev.* 16, 2485–90.
- Cosma M.P., Panizza S., Nasmyth K. (2001). Cdk1 triggers association of RNA polymerase to cell cycle promoters only after recruitment of the mediator by SBF. *Mol Cell* 7, 1213–1220.
- Costanzo M., Nishikawa J.L., Tang X., Millman J.S., Schub O., Breitkreuz K., Dewar D., Rupes I., Andrews B., Tyers M. (2004). CDK activity antagonizes Whi5, an inhibitor of G1/S transcription in yeast. *Cell* 117, 899–913.
- Coudreuse D., Nurse P. (2010). Driving the cell cycle with a minimal CDK control network. *Nature* 468, 1074–9.
- Craven R.J., Greenwell P.W., Dominska M., Petes T.D. (2002). Regulation of genome stability by TEL1 and MEC1, yeast homologs of the mammalian ATM and ATR genes. *Genetics* 161, 493–507.
- Cross F.R. (1990). Cell cycle arrest caused by *CLN* gene deficiency in *Saccharomyces cerevisiae* resembles START-I arrest and is independent of the mating-pheromone signalling pathway. *Mol. Cell. Biol.* 10, 6482–6490.
- Cross F.R., Archambault V., Miller M., Klovstad M. (2002). Testing a mathematical model of the yeast cell cycle. *Mol. Biol. Cell* 13, 52–70.
- Cross F.R., Blake C.M. (1993). The yeast Cln3 protein is an unstable activator of Cdc28. *Mol. Cell. Biol.* 13, 3266–3271.
- Cross F.R., Jacobson M.D. (2000). Conservation and function of a potential substrate-binding domain in the yeast Clb5 B-type cyclin. *Mol. Cell Biol.* 20, 4782–90.

- Cross F.R., Yuste-Rojas M., Gray S., Jacobson M.D. (1999). Specialization and targeting of B-type cyclins. *Mol. Cell* 4, 11-9.
- Dahmann C., Diffley J.F., Nasmyth K.A. (1995). S-phase-promoting cyclin-dependent kinases prevent re-replication by inhibiting the transition of replication origins to a pre-replicative state. *Curr. Biol.* 5, 1257-1269.
- Daley J.M., Palmboos P.L., Wu D., Wilson T.E. (2005). Nonhomologous end joining in yeast. *Annu. Rev. Genetics* 39, 431-51.
- D'Amours D., Jackson S.P. (2001). The yeast Xrs2 complex functions in S phase checkpoint regulation. *Genes Dev.* 15, 2238-49.
- Davé A., Cooley C., Garg M., Bianchi A. (2014). Protein phosphatase 1 recruitment by Rif1 regulates DNA replication origin firing by counteracting DDK activity. *Cell Rep.* 7, 53-61.
- de Bruin R.A., Kalashnikova T.I., Chahwan C., McDonald W.H., Wohlschlegel J., Yates J., Russell P., Wittenberg C. (2006). Constraining G1-specific transcription to late G1 phase: the MBF-associated corepressor Nrm1 acts via negative feedback. *Mol. Cell* 23, 483-496.
- de Bruin R.A., McDonald W.H., Kalashnikova T.I., Yates J., Wittenberg C. (2004). Cln3 activates G1-specific transcription via phosphorylation of the SBF bound repressor Whi5. *Cell* 117, 887-898.
- Dewar J.M., Lydall D. (2010). Pif1- and Exo1-dependent nucleases coordinate checkpoint activation following telomere uncapping. *EMBO J.* 29, 4020-34.
- Dewar J.M., Lydall D. (2012). Similarities and differences between “uncapped” telomeres and DNA double-strand breaks. *Chromosoma* 121, 117-30.
- DeZwaan D.C., Toogun O.A., Echtenkamp F.J., Freeman B.C. (2009). The Hsp82 molecular chaperone promotes a switch between unextendable and extendable telomere states. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 711-6.
- Diede S.J., Gottschling D.E. (1999). Telomerase-mediated telomere addition in vivo requires DNA primase and DNA polymerases alpha and delta. *Cell* 99, 723-33.
- Diede S.J., Gottschling D.E. (2001). Exonuclease activity is required for sequence addition and Cdc13p loading at a de novo telomere. *Curr. Biol.* 11, 1336-40.
- Dionne I., Wellinger R.J. (1996). Cell cycle-regulated generation of single-stranded G-rich DNA in the absence of telomerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 13902-7.

- Dionne I., Wellinger R.J. (1998). Processing of telomeric DNA ends requires the passage of a replication fork. *Nucleic Acids Res.* 26, 5365–71.
- Donaldson A.D. (2000). The yeast mitotic cyclin Clb2 cannot substitute for S phase cyclins in replication origin firing. *EMBO Rep.* 1, 507-12.
- Donaldson A.D., Raghuraman M.K., Friedman K.L., Cross F.R., Brewer B.J., Fangman W.L. (1998). CLB5-dependent activation of late replication origins in *S. cerevisiae*. *Mol. Cell* 2, 173-82
- Donovan J.D., Toyn J.H., Johnson A.L., Johnston L.H. (1994). P40SDB25, a putative CDK inhibitor, has a role in the M/G1 transition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 8, 1640-53.
- Downs J.A., Allard S., Jobin-Robitaille O., Javaheri A., Auger A., Bouchard N., Kron S.J., Jackson S.P., Côté J. (2004). Binding of chromatin-modifying activities to phosphorylated histone H2A at DNA damage sites. *Mol. Cell* 16, 979-90.
- Draetta G., Luca F., Westendorf J., Brizuela L., Ruderman J., Beach D. (1989). cdc2 protein kinase is complexed with both cyclin A and B: evidence for proteolytic inactivation of MPF. *Cell* 56, 829–838.
- Ear P.H., Booth M.J., Abd-Rabbo D., Kowarzyk Moreno J., Hall C., Chen D., Vogel J., Michnick S.W. (2013). Dissection of Cdk1-cyclin complexes in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 15716-21.
- Enserink J.M., Hombauer H., Huang M.E., Kolodner R.D. (2009). Cdc28/Cdk1 positively and negatively affects genome stability in *S. cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 185, 423-437.
- Enserink J.M., Kolodner R.D. (2010). An overview of Cdk1-controlled targets and processes. *Cell Division* 5, 11.
- Epstein C.B., Cross F.R. (1992). *CLB5*: a novel B cyclin from budding yeast with a role in S phase. *Genes Dev.* 6, 1695–1706.
- Espinoza F.H., Farrell A., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Morgan D.O. (1996). A cyclin-dependent kinase-activating kinase (CAK) in budding yeast unrelated to vertebrate CAK. *Science* 273, 1714-7.
- Evans T., Rosenthal E.T., Youngblom J., Distel D., Hunt T. (1983). Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 33, 389–396.

- Faure V., Coulon S., Hardy J., Geli V. (2010). Cdc13 and telomerase bind through different mechanisms at the lagging- and leading-strand telomeres. *Mol. Cell*, 38, 842–52.
- Ferdous A., Gonzalez F., Sun L., Kodadek T., Johnston S.A. (2001). The 19S regulatory particle of the proteasome is required for efficient transcription elongation by RNA polymerase II. *Mol. Cell* 7, 981-91.
- Ferguson B.M., Fangman W.L. (1992). A position effect on the time of replication origin activation in yeast. *Cell* 68, 333-9.
- Ferreira M.G., Cooper J.P. (2004). Two modes of DNA double-strand break repair are reciprocally regulated through the fission yeast cell cycle. *Genes Dev.* 18, 2249-54.
- Fiedler D., Braberg H., Mehta M., Chechik G., Cagney G., Mukherjee P., Silva A.C., Shales M., Collins S.R., van Wageningen S., Kemmeren P., Holstege F.C., Weissman J.S., Keogh M.C., Koller D., Shokat K.M., Krogan N.J. (2009). Functional organization of the *S. cerevisiae* phosphorylation network. *Cell* 136, 952-63.
- Fisher T.S., Taggart A.K., Zakian V.A. (2004). Cell cycle-dependent regulation of yeast telomerase by Ku. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 1198-205.
- Fisher T.S., Zakian V.A. (2005). Ku: a multifunctional protein involved in telomere maintenance. *DNA Repair* 4, 1215-26.
- Fitch I., Dahmann C., Surana U., Amon A., Nasmyth K., Goetsch L., Byers B., Futcher B. (1992). Characterization of four B-type cyclin genes of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 3, 805–818.
- Flick K., Chapman-Shimshoni D., Stuart D., Guaderrama M., Wittenberg C. (1998). Regulation of cell size by glucose is exerted via repression of the CLN1 promoter. *Mol. Cell. Biol.* 18, 2492–2501.
- Förstemann K., Lingner J. (2001). Molecular basis for telomere repeat divergence in budding yeast. *Mol. Cell Biol.* 21, 7277-86.
- Foster S.S., Balestrini A., Petrini J.H. (2011). Functional interplay of the Mre11 nuclease and Ku in the response to replication-associated DNA damage. *Mol. Cell Biol.* 31, 4379-89.
- Foster S.S., Zubko M.K., Guillard S., Lydall D. (2006). MRX protects telomeric DNA at uncapped telomeres of budding yeast cdc13-1 mutants. *DNA Repair* 5, 840–51.
- Frank C.J., Hyde M., Greider C.W. (2006). Regulation of telomere elongation by the cyclin-dependent kinase CDK1. *Mol. Cell* 24, 423–32.

- Frank-Vaillant M., Marcand S. (2002). Transient stability of DNA ends allows nonhomologous end joining to precede homologous recombination. *Mol. Cell* *10*, 1189-99.
- Fukunaga K., Hirano Y., Sugimoto K. (2012). Subtelomere-binding protein Tbf1 and telomere-binding protein Rap1 collaborate to inhibit localization of the Mre11 complex to DNA ends in budding yeast. *Mol. Biol. Cell* *23*, 347-59.
- Fuster J.J., Andrés V. (2006). Telomere biology and cardiovascular disease. *Circ. Res.* *99*, 1167-80.
- Gallardo F., Laterreur N., Cusanelli E., Ouenzar F., Querido E., Wellinger R.J., Chartrand P. (2011). Live cell imaging of telomerase RNA dynamics reveals cell cycle-dependent clustering of telomerase at elongation telomeres. *Mol. Cell* *44*, 819-27.
- Gallardo F., Olivier C., Dandjinou A.T., Wellinger R.J., Chartrand P. (2008). TLC1 RNA nucleo-cytoplasmic trafficking links telomerase biogenesis to its recruitment to telomeres. *EMBO J.* *27*, 748-57.
- Gao H., Cervantes R.B., Mandell E.K., Otero J.H., Lundblad V. (2007). RPA-like proteins mediate yeast telomere function. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *14*, 208-14.
- Gao H., Toro T.B., Paschini M., Braunstein-Ballew B., Cervantes R.B., Lundblad V. (2010). Telomerase recruitment in *Saccharomyces cerevisiae* is not dependent on Tel1-mediated phosphorylation of Cdc13. *Genetics* *186*, 1147-59.
- Garí E., Volpe T., Wang H., Gallego C., Fitcher B., Aldea M. (2001). Whi3 binds the mRNA of the G1 cyclin CLN3 to modulate cell fate in budding yeast. *Genes Dev.* *15*, 2803-8.
- Garvik B., Carson M., Hartwell L. (1995). Single-stranded DNA arising at telomeres in *cdc13* mutants may constitute a specific signal for the RAD9 checkpoint. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 6128-38.
- Gelinas A.D., Paschini M., Reyes F.E., Héroux A., Batey R.T., Lundblad V., Wuttke D.S. (2009). Telomere capping proteins are structurally related to RPA with an additional telomere-specific domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *106*, 19298-303.
- Gautier J., Minshull J., Lohka M., Glotzer M., Hunt T., Maller J.L. (1990). Cyclin is a component of maturation-promoting factor from *Xenopus*. *Cell* *60*, 487-494.
- Geymonat M., Spanos A., Wells G.P., Smerdon S.J., Sedgwick S.G. (2004). Clb6/Cdc28 and Cdc14 regulate phosphorylation status and cellular localization of Swi6. *Mol. Cell Biol.* *24*, 2277-2285.

- Ghiara J.B., Richardson H.E., Sugimoto K., Henze M., Lew D.J., Wittenberg C., Reed S.I. (1991). A cyclin B homolog in *S. cerevisiae*: chronic activation of the Cdc28 protein kinase by cyclin prevents exit from mitosis. *Cell* 65, 163–174.
- Gibson D.G., Aparicio J.G., Hu F., Aparicio O.M. (2004). Diminished S-phase cyclin-dependent kinase function elicits vital Rad53-dependent checkpoint responses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 24, 10208–22.
- Gilson E., Roberge M., Giraldo R., Rhodes D., Gasser S. (1993). Distortion of the DNA double helix by RAP1 at silencers and multiple telomeric binding sites. *J. Mol. Biol.* 231, 293–310.
- Gonzalez F., Delahodde A., Kodadek T., Johnston S.A. (2002). Recruitment of a 19S proteasome subcomplex to an activated promoter. *Science* 296, 548–50.
- Gotta M., Laroche T., Formenton A., Maillet L., Scherthan H., Gasser S.M. (1996). The clustering of telomeres and colocalization with Rap1, Sir3, and Sir4 proteins in wild-type *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell. Biol.* 134, 1349–63.
- Goudsouzian L.K., Tuzon C.T., Zakian V.A. (2006). *S. cerevisiae* Tel1p and Mre11p are required for normal levels of Est1p and Est2p telomere association. *Mol. Cell* 24, 603–10.
- Graham I.R., Haw R.A., Spink K.G., Halden K.A., Chambers A. (1999). In vivo analysis of functional regions within yeast Rap1p. *Mol. Cell. Biol.* 19, 7481–90.
- Grandin N., Charbonneau M. (2007). Mrc1, a non-essential DNA replication protein, is required for telomere end protection following loss of capping by Cdc13, Yku or telomerase. *Mol. Genet. Genomics* 277, 685–99.
- Grandin N., Damon C., Charbonneau M. (2001). Ten1 functions in telomere end protection and length regulation in association with Stn1 and Cdc13. *EMBO J.* 20, 1173–83.
- Grandin N., Reed S.I. (1993). Differential function and expression of *Saccharomyces cerevisiae* B-type cyclins in mitosis and meiosis. *Mol. Cell. Biol.* 13, 2113–2125.
- Grandin N., Reed S.I., Charbonneau M. (1997). Stn1, a new *Saccharomyces cerevisiae* protein, is implicated in telomere size regulation in association with Cdc13. *Genes Dev.* 11, 512–27.
- Gravel S., Larrivée M., Labrecque P., Wellinger R.J. (1998). Yeast Ku as a regulator of chromosomal DNA end structure. *Science* 280, 741–4.



- Greenwell P.W., Kronmal S.L., Porter S.E., Gassenhuber J., Obermaier B., Petes T.D. (1995). TEL1, a gene involved in controlling telomere length in *S. cerevisiae*, is homologous to the human ataxia telangiectasia gene. *Cell* 82, 823-9.
- Greider C.W., Blackburn E.H. (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* 43, 405–13.
- Grenon M., Gilbert C., Lowndes N.F. (2001). Checkpoint activation in response to double-strand breaks requires the Mre11/Rad50/Xrs2 complex. *Nat. Cell. Biol.* 3, 844-7.
- Grossi S., Puglisi A., Dmitriev P.V., Lopes M., Shore D. (2004). Pol12, the B subunit of DNA polymerase alpha, functions in both telomere capping and length regulation. *Genes Dev.* 18, 992-1006.
- Guillemette B., Bataille A.R., Gévry N., Adam M., Blanchette M., Robert F., Gaudreau L. (2005). Variant histone H2A.Z is globally localized to the promoters of inactive yeast genes and regulates nucleosome positioning. *PLoS Biol.* 3, e384.
- Guthier C., Fink G.R. (1991). *Guide to yeast genetics and molecular biology*. Academic Press, San Diego, CA.
- Haase S.B., Reed S.I. (1999). Evidence that a free-running oscillator drives G1 events in the budding yeast cell cycle. *Nature* 401, 394-397.
- Hadwiger J.A., Wittenberg C., Richardson H.E., de Barros Lopes M., Reed S.I. (1989). A family of cyclin homologs that control the G1 phase in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6255–6259.
- Hall B.G., Acar H., Nandipati A., Barlow M. (2013). Growth rates made easy. *Mol. Biol. Evol.* 31, 232-8.
- Hammet A., Magill C., Heierhorst J., Jackson S.P. (2007). Rad9 BRCT domain interaction with phosphorylated H2AX regulates the G1 checkpoint in budding yeast. *EMBO Rep.* 8, 851-7.
- Hang L.E., Liu X., Cheung I., Yang Y., Zhao X. (2011). SUMOylation regulates telomere length homeostasis by targeting Cdc13. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 920-6.
- Hanks S.K., Hunter T. (1995). Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* 9, 576–596.
- Hardy J., Churikov D., Géli V., Simon M.N. (2014). Sgs1 and Sae2 promote telomere replication by limiting accumulation of ssDNA. *Nat. Commun.* 5, 5004.

- Hardy C.F., Sussel L., Shore D. (1992). A RAP1-interacting protein involved in transcriptional silencing and telomere length regulation. *Genes Dev.* 6, 801–814.
- Harrison J.C., Haber J.E. (2006). Surviving the breakup: the DNA damage checkpoint. *Annu. Rev. Genet.* 40, 209-35.
- Hartwell L.H. (1974). *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *Bacteriol Rev.* 38, 164-98.
- Hartwell L.H., Mortimer R.K., Culotti J., Culotti M. (1973). Genetic control of the cell division cycle in yeast: V. Genetic analysis of cdc mutants. *Genetics* 74, 267-86.
- Hector R.E., Shrofman R.L. Ray A., Chen B.R., Nyun T., Berkner K.L. Runge K.W. (2007). Tel1p preferentially associates with short telomeres to stimulate their elongation. *Mol. Cell* 27, 851-8.
- Hiraga S., Alvino G.M., Chang F., Lian H.Y., Sridhar A., Kubota T., Brewer B.J., Weinreich M., Raghuraman M.K., Donaldson A.D. (2014). Rif1 controls DNA replication by directing Protein Phosphatase 1 to reverse Cdc7-mediated phosphorylation of the MCM complex. *Genes Dev.* 28, 372-83.
- Hirano Y., Fukunaga K., Sugimoto K. (2009). Rif1 and rif2 inhibit localization of tel1 to DNA ends. *Mol. Cell* 33, 312–22.
- Holstein E.M., Clark K.R., Lydall D. (2014). Interplay between nonsense-mediated mRNA decay and DNA damage response pathways that Stn1 and Ten1 are the key CST telomere-cap components. *Cell Rep.* 7, 1259-69.
- Holt L.J., Tuch B.B., Villén J., Johnson A.D., Gygi S.P., Morgan D.O. (2009). Global analysis of Cdk1 substrate phosphorylation sites provides insights into evolution. *Science* 325, 1682-6.
- Huang D., Friesen H., Andrews B. (2007). Pho85, a multifunctional cyclin-dependent protein kinase in budding yeast. *Mol. Microbiol.* 66, 303-314.
- Huertas P., Cortes-Ledesma F., Sartori A.A., Aguilera A., Jackson S.P. (2008). CDK targets Sae2 to control DNA-end resection and homologous recombination. *Nature* 455, 689–92.
- Hu F., Wang Y., Liu F., Li Y., Qin J., Elledge S.J. (2001). Regulation of the Bub2/Bfa1 GAP complex by Cdc5 and cell cycle checkpoint. *Cell* 107, 655-65.
- Hughes T.R., Weilbaecher R.G., Walterscheid M., Lundblad V. (2000). Identification of the single-strand telomeric DNA binding domain of the *Saccharomyces cerevisiae* Cdc13 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 6457–62.

- Imai S., Armstrong C.M., Kaeberlein M., Guarente L. (2000). Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* 403, 795–800.
- Ira G., Pelliccioli A., Balijja A., Wang X., Fiorani S., Carotenuto W., Liberi G., Bressan D., Wan L., Hollingsworth N.M., Haber J.E., Foiani M. (2004). DNA end resection, homologous recombination and DNA damage checkpoint activation require CDK1. *Nature* 431, 1011–1017.
- Ivessa A.S., Zhou J.Q., Schulz V.P., Monson E.K., Zakian V.A. (2002). *Saccharomyces* Rrm3p, a 5' to 3' DNA helicase that promotes replication fork progression through telomeric and subtelomeric DNA. *Genes Dev.* 16, 1383–96.
- Jackson S.P., Bartek J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461, 1071–8.
- Jia X., Weinert T., Lydall D. (2004). Mec1 and Rad53 inhibit formation of single-stranded DNA at telomeres of *Saccharomyces cerevisiae* cdc13-1 mutants. *Genetics* 166, 753–64.
- Kaldis P., Sutton A., Solomon M.J. (1996). The Cdk-activating kinase (CAK) from budding yeast. *Cell* 86, 553–564.
- Katou Y., Kanoh Y., Bando M., Noguchi H., Tanaka H., Ashikari T., Sugimoto K., Shirahige K. (2003). S-phase checkpoint proteins Tof1 and Mrc1 form a stable replication-pausing complex. *Nature* 424, 1078–83.
- Karathanasis E., Wilson T.E. (2002). Enhancement of *Saccharomyces cerevisiae* end-joining efficiency by cell growth stage but not by impairment of recombination. *Genetics* 161, 1015–27.
- Kim J.A., Kruhlak M., Dotiwala F., Nussenzweig A., Haber J.E. (2007). Heterochromatin is refractory to gamma-H2AX modification in yeast and mammals. *The Journal of cell biology* 178, 209–18.
- Kironmai K., Muniyappa K. (1997). Alteration of telomeric sequences and senescence caused by mutations in RAD50 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Cells* 2, 443–455.
- Kitazono A.A., Kron S.J. (2002). An essential function of yeast cyclin-dependent kinase Cdc28 maintains chromosome stability. *J. Biol. Chem.* 277, 48627–34.
- Knop M., Siegers K., Pereira G., Zachariae W., Winsor B., Nasmyth K., Schiebel E. (1999). Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast* 15, 963–72.

- Kobayashi H., Stewart E., Poon R., Adamczewski J.P., Gannon J., Hunt T. (1992). Identification of the domains in cyclin A required for binding to, and activation of, p34cdc2 and p32cdk2 protein kinase subunits. *Mol. Biol. Cell.* 3, 1279–1294.
- Koch C., Schleiffer A., Ammerer G., Nasmyth K. (1996). Switching transcription on and off during the yeast cell cycle: Cln/Cdc28 kinases activate bound transcription factor SBF (Swi4/Swi6) at start, whereas Clb/Cdc28 kinases displace it from the promoter in G2. *Genes Dev.* 10, 129-41.
- Koering C.E., Fourel G., Binet-Brasselet E., Laroche T., Klein F., Gilson E. (2000). Identification of high affinity Tbf1p-binding sites within the budding yeast genome. *Nucleic Acids Res.* 28, 2519-26.
- Kõivomägi M., Loog M. (2011). Cdk1 a kinase with changing substrate specificity. *Cell cycle* 10, 3625-3626
- Kõivomägi M., Valk E., Venta R., Lofik A., Lepiku M., Balog E.R., Rubin S.M., Morgan D.O., Loog M. (2011). Dynamics of Cdk1 substrate specificity during the cell cycle. *Mol. Cell* 42, 610-23.
- Kondo T., Wakayama T., Naiki T., Matsumoto K., Sugimoto K. (2001). Recruitment of Mec1 and Ddc1 checkpoint proteins to double-strand breaks through distinct mechanisms. *Science* 294, 867-70.
- Kosugi S., Hasebe M., Tomita M., Yanagawa H. (2009). Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleoplasmic shuttling proteins via prediction of composite motifs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 13142.
- Krishna S., Wagener B.M., Liu H.P., Lo Y.C., Sterk R., Petrini J.H., Nickoloff J.A. (2007). Mre11 and Ku regulation of double-strand break repair by gene conversion and break-induced replication. *DNA Repair* 6, 797-808.
- Kühne C., Linder P. (1993). A new pair of B-type cyclins from *Saccharomyces cerevisiae* that function early in the cell cycle. *EMBO J.* 12, 3437–3447.
- Kyrion G., Boakye K.A., Lustig A.J. (1992). C-terminal truncation of RAP1 results in the deregulation of telomere size, stability, and function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 12, 5159–73.
- Langerak P., Russell P. (2011). Regulatory networks integrating cell cycle control with DNA damage checkpoints and double-strand break repair. *Philos. Trans. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 366, 3562-3571

- Lanker S., Valdivieso M.H., Wittenberg C. (1996). Rapid degradation of the G1 cyclin Cln2 induced by CDK-dependent phosphorylation. *Science* 271, 1597-1601.
- Larrivée M., Lebel C., Wellinger R.J. (2004). The generation of proper constitutive G-tails on yeast telomeres is dependent on the MRX complex. *Genes Dev.* 18, 1391-1396.
- Lazzaro F., Sapountzi V., Granata M., Pelliccioli A., Vaze M., Haber J.E., Plevani P., Lydall D., Muzi-Falconi M. (2008). Histone methyltransferase Dot1 and Rad9 inhibit single-stranded DNA accumulation at DSBs and uncapped telomeres. *EMBO J.* 27, 1502-12.
- Lee M., Gallagher R., Bradley J., Blackburn E. (1993). In vivo and in vitro studies of telomeres and telomerase. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, pp. 707-718.
- Lengronne A., Schwob E. (2002). The yeast CDK inhibitory Sic1 prevents genomic instability by promoting replication origin licensing in late G(1). *Mol. Cell* 9, 1067-78.
- Levine K., Huang K., Cross F.R. (1996). *Saccharomyces cerevisiae* G1 cyclins differ in their intrinsic functional specificities. *Mol. Cell. Biol.* 16, 6794-6803.
- Lew D.J., Reed SI. (1993). Morphogenesis in the yeast cell cycle, regulation by Cdc28 and cyclins. *J. Cell. Biol.* 120, 1305-1320.
- Li S., Makovets S., Matsuguchi T., Blethrow J.D., Shokat K.M., Blackburn E.H. (2009). Cdk1-dependent phosphorylation of Cdc13 coordinates telomere elongation during cell-cycle progression. *Cell* 136, 50-61.
- Li Y., Cross F.R., Chait B.T. (2014). Method for identifying phosphorylated substrates of specific cyclin/cyclin-dependent kinase complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 111, 11323-8.
- Lian H.Y., Robertson E.D., Hiraga S., Alvino G.M., Collingwood D., McCune H.J., Sridhar A., Brewer B.J., Raghuraman M.K., Donaldson A.D. (2011). The effect of Ku on telomere replication time is mediated by telomere length but is independent of histone tail acetylation. *Mol. Biol. Cell* 22, 1753-65.
- Lieber M.R. (2010). The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu. Rev. Biochem.* 79, 181-211.
- Lieb J.D., Liu X., Botstein D., Brown P.O. (2001). Promoter-specific binding of Rap1 revealed by genome-wide maps of protein-DNA association. *Nat. Genet.* 28, 327-34.
- Lindahl T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362, 709-715.

- Lingner J., Cooper J.P., Cech T.R. (1995). Telomerase and DNA end replication: no longer a lagging strand problem? *Science* 269, 1533–1534.
- Lin J.J., Zakian V.A. (1996). The *Saccharomyces* CDC13 protein is a single-strand TG1-3 telomeric DNA-binding protein in vitro that affects telomere behavior in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 13760-5.
- Liu C.C., Gopalakrishnan V., Poon L.F., Yan T., Li S. (2014). Cdk1 regulates the temporal recruitment of telomerase and Cdc13-Stn1-Ten1 complex for telomere replication. *Mol. Cell Biol.* 34, 57-70.
- Lisby M., Barlow J.H., Burgess R.C., Rothstein R. (2004). Choreography of the DNA damage response: spatiotemporal relationships among checkpoint and repair proteins. *Cell* 118, 699-713.
- Li X., Cai M. (1997). Inactivation of the cyclin-dependent kinase Cdc28 abrogates cell cycle arrest induced by DNA damage and disassembly of mitotic spindles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 17, 2723-34.
- Loog M., Morgan D.O. (2005). Cyclin specificity in the phosphorylation of cyclin-dependent kinase substrates. *Nature* 434, 104-8.
- Lopes J., Piazza A., Bermejo R., Kriegsman B., Colosio A., Teulade-Fichou M.P., Foiani M., Nicolas A. (2011). G-quadruplex-induced instability during leading-strand replication. *EMBO J.* 30, 4033-46.
- Lopez C.R., Ribes-Zamora A., Indiviglio S.M., Williams C.L., Haricharan S., Bertuch A.A. (2011). Ku must load directly onto the chromosome end in order to mediate its telomeric functions. *PLoS Genet.* 7, e1002233.
- Lörincz A.T., Reed S.I. (1984). Primary structure homology between the product of yeast cell division control gene CDC28 and vertebrate oncogenes. *Nature* 307, 183-5.
- Louis E.J., Haber J.E. (1992). The structure and evolution of subtelomeric Y' repeats in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 131, 559-74.
- Lustig A.J., Kurtz S., Shore D. (1990). Involvement of the silencer and UAS binding protein RAP1 in regulation of telomere length. *Science* 250, 549-53.
- Lustig A.J., Petes T.D. (1986). Identification of yeast mutants with altered telomere structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 1398-402.
- Lydall D. (2009). Taming the tiger by the tail: modulation of DNA damage responses by telomeres. *EMBO J.* 28, 2174–87.

- Lydall D., Weinert T. (1995). Yeast checkpoint genes in DNA damage processing: implications for repair and arrest. *Science* 270, 1488–91.
- Lydall D., Weinert T. (1997). Use of *cdc13-1*-induced DNA damage to study effects of checkpoint genes on DNA damage processing. *Methods Enzymol.* 283, 410–424.
- Majka J., Burgers P.M. (2003). Yeast Rad17/Mec3/Ddc1: a sliding clamp for the DNA damage checkpoint. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 100, 2249–54.
- Makovets S., Herskowitz I., Blackburn E.H. (2004). Anatomy and Dynamics of DNA Replication Fork Movement in Yeast Telomeric Regions †‡. *Mol. Cell. Biol.* 24, 4019–4031.
- Marcand S., Gilson E., Shore D. (1997). A Protein-Counting Mechanism for Telomere Length Regulation in Yeast. *Science* 275, 986–990.
- Marcand S., Pardo B., Gratias A., Cahun S., Callebaut I. (2008). Multiple pathways inhibit NHEJ at telomeres. *Genes Dev.* 22, 1153–1158.
- Maringele L., Lydall D. (2002). EXO1-dependent single-stranded DNA at telomeres activates subsets of DNA damage and spindle checkpoint pathways in budding yeast *yku70* mutants. *Genes Dev.* 16, 1919–1933.
- Martina M., Bonetti D., Villa M., Lucchini G., Longhese M.P. (2014). *Saccharomyces cerevisiae* Rif1 cooperates with MRX-Sae2 in promoting DNA-end resection. *EMBO Rep.* 15, 695–704.
- Martina M., Clerici M., Baldo V., Bonetti D., Lucchini G., Longhese M.P. (2012). A balance between Tel1 and Rif2 activities regulates nucleolytic processing and elongation at telomeres. *Mol. Cell Biol.* 32, 1604–17.
- Marini N.J., Reed S.I. (1992). Direct induction of G1-specific transcripts following reactivation of the Cdc28 kinase in the absence of de novo protein synthesis. *Genes Dev.* 6, 557–567.
- Martin S.G., Laroche T., Suka N., Grunstein M., Gasser S.M. (1999). Relocalization of telomeric Ku and SIR proteins in response to DNA strand breaks in yeast. *Cell* 97, 621–33.
- Mattarocci S., Shyian M., Lemmens L., Damay P., Altintas D.M., Shi T., Bartholomew C.R., Thomä N.H., Hardy C.F., Shore D. (2014). Rif1 controls DNA replication timing in yeast through the PP1 phosphatase Glc7. *Cell Rep.* 7, 62–9.
- McClintock B. (1939). The behavior in successive nuclear divisions of a chromosome broken at meiosis. *Genetics* 25, 405–416.

- McGee J.S., Phillips J.A., Chan A., Sabourin M., Paeschke K., Zakian V.A. (2010). Reduced Rif2 and lack of Mec1 target short telomeres for elongation rather than double-strand break repair. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 1438-45.
- McLellan J.L., O'Neil N.J., Barrett I., Ferree E., van Pel D.M., Ushey K., Sipahimalani P., Bryan J., Rose A.M., Hieter P. (2012). Synthetic lethality of cohesins with PARPs and replication fork mediators. *PLoS Genet.* 8, e1002574.
- Meijer L., Arion D., Golsteyn R., Pines J., Brizuela L., Hunt T., Beach D. (1989). Cyclin is a component of the sea urchin egg M-phase specific histone H1 kinase. *EMBO J.* 8, 2275–2282.
- Melo J.A., Cohen J., Toczyski D.P. (2001). Two checkpoint complexes are independently recruited to sites of DNA damage in vivo. *Genes Dev.* 15, 2809-21.
- Meinhart A., Kamenski T., Hoepfner S., Baumli S., Cramer P. (2005). A structural perspective of CTD function. *Genes Dev.* 19, 1401-1415.
- Mendenhall M.D. (1993). An inhibitor of p34CDC28 protein kinase activity from *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 259, 216-9.
- Mendenhall M.D., Hodge A.E. (1998). Regulation of Cdc28 cyclin-dependent protein kinase activity during cell cycle of the yeast *S. cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 1191-1243.
- Meyn M.A. 3rd, Holloway S.L. (2000). S-phase cyclins are required for a stable arrest at metaphase. *Curr. Biol.* 10, 1599-602.
- Mieczkowski P.A., Mieczkowska J.O., Dominska M., Petes T.D. (2003). Genetic regulation of telomere-telomere fusions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 10854–9.
- Miller K.M., Rog O., Cooper J.P. (2006). Semi-conservative DNA replication through telomeres requires Taz1. *Nature* 440, 824-8.
- Mimitou E.P., Symington L.S. (2008). Sae2, Exo1 and Sgs1 collaborate in DNA double-strand break processing. *Nature* 455, 770-774.
- Mimitou E.P., Symington L.S. (2010). Ku prevents Exo1 and Sgs1-dependent resection of DNA ends in the absence of a functional MRX complex or Sae2. *EMBO J.* 29, 3358-69.
- Mimitou E.P., Symington L.S. (2011). DNA end resection-unraveling the tail. *DNA Repair* 10, 344-8.



- Mimori T., Hardin J.A. (1986). Mechanism of interaction between Ku protein and DNA. *J. Biol. Chem.* *261*, 10375-9.
- Minamino T., Orimo M., Shimizu I., Kunieda T., Yokoyama M., Ito T., Nojima A., Nabetani A., Oike Y., Matsubara H., Ishikawa F., Komuro I. (2009). A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance. *Nat. Med.* *15*, 1082-7.
- Mitchell J.R., Wood E., Collins K. (1999). A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenital. *Nature* *402*, 551-5.
- Mitton-Fry R.M., Anderson E.M., Hughes T.R., Lundblad V., Wuttke D.S. (2002). Conserved structure for single-stranded telomeric DNA recognition. *Science* *296*, 145-7.
- Moore J.K., Haber J.E. (1996). Cell cycle and genetic requirements of two pathways of nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 2164-73.
- Moretti P., Freeman K., Coodly L., Shore D. (1994). Evidence that a complex of SIR proteins interacts with the silencer and telomere-binding protein RAP1. *Genes Dev.* *8*, 2257-2269.
- Morgan D.O. (1995). Principles of CDK regulation. *Nature* *374*, 131-4.
- Morin I., Ngo H.P., Greenall A., Zubko M.K., Morrice N., Lydall D. (2008). Checkpoint-dependent phosphorylation of ExoI modulates the DNA damage response. *EMBO J.* *27*, 2400-10.
- Morin G.B. (1989). The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell* *59*, 521-9.
- Morrow D.M., Tagle D.A., Shiloh Y., Collins F.S., Hieter P. (1995). TEL1, an *S. cerevisiae* homolog of the human gene mutated in ataxia telangiectasia, is functionally related to the yeast checkpoint gene MEC1. *Cell* *82*, 831-40.
- Moyzis R.K., Buckingham J.M., Cram L.S., Dani M., Deaven L.L., Jones M.D., Meyne J., Radtcliff R.L., Wu J.R. (1988). A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)<sub>n</sub> present at the telomeres of human chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *85*, 6622-6.
- Muller H.J. (1938). The remaking of chromosomes. *The Collecting Net* *13*, 181-198.
- Nakada D., Matsumoto K., Sugimoto K. (2003). ATM-related Tel1 associates with double-strand breaks through an Xrs2-dependent mechanism. *Genes Dev.* *17*, 1957-62.
- Nasmyth K.A., Reed S.I. (1980). Isolation of genes by complementation in yeast: molecular cloning of a cell-cycle gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *77*, 2119-23.

- Ngo H.P., Lydall D. (2010). Survival and growth of yeast without telomere capping by Cdc13 in the absence of Sgs1, Exo1, and Rad9. *PLoS Genet.* 6, e1001072.
- Nigg E.A. (1993). Targets of cyclin-dependent protein kinases. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5, 187-93.
- Noble M.E.M., Endicott J.A., Brown N.R., Johnson L.N. (1997). The cyclin box fold: protein recognition in cell-cycle and transcription control. *Trends Biochem. Sci.* 22, 482–487.
- Nicolette M.L., Lee K., Gio Z., Rani M., Chow J.M., Lee S.E., Paull T.T. (2010). Mre11-Rad50-Xrs2 and Sae2 promote 5' strand resection of DNA double-strand breaks. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 1478-85.
- Niu H., Chung W.H., Zhu Z., Kwon Y., Zhao W., Chi P., Prakash R., Seong C., Liu D., Lu L., Ira G., Sung P. (2010). Mechanism of the ATP-dependent DNA end-resection machinery from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 467, 108-11.
- Nugent C.I., Bosco G., Ross L.O., Evans S.K., Salinger A.P., Moore J.K., Haber J.E., Lundblad V. (1998). Telomere maintenance is dependent on activities required for end repair of double-strand breaks. *Curr. Biol.* 8, 657–60.
- Nugent C.I., Hughes T.R., Lue N.F., Lundblad V. (1996). Cdc13p: a single-strand telomeric DNA-binding protein with a dual role in yeast telomere maintenance. *Science* 274, 249–52.
- Nugroho T.T., Mendenhall M.D. (1994). An inhibitory of yeast cyclin-dependent protei kinase plays an important role in ensuring the genomic integrity of daughter cells. *Mol. Cell Biol.* 14, 3320-8.
- Ogas J., Andrews B.J., Herskowitz I. (1991). Transcriptional activation of *CLN1*, *CLN2*, and a putative new G1 cyclin (*HCS26*) by SWI4, a positive regulator of G1-specific transcription. *Cell* 66, 1015–1026.
- Ohki R., Tsurimoto T., Ishikawa F. (2001). In Vitro Reconstitution of the End Replication Problem. *Mol. Cell. Biol.* 21, 5753–5766.
- Olovnikov A. (1971). Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides. *Dokl. Akad. Nauk. SSSR* 201, 1496–9.
- Osborn A.J., Elledge A.J. (2003). Mrc1 is a replication fork component whose phosphorylation in response to DNA replication stress activates Rad53. *Genes Dev.* 17, 1755-67.

- Paeschke K., Bochman M.L., Garcia P.D., Cejka P., Friedman K.L., Kowalczykowski S.C., Zakian V.A. (2013). Pif1 family helicases suppress genome instability at G-quadruplex motifs. *Nature* 497, 458-62.
- Paeschke K., Capra J.A., Zakian V.A. (2011). DNA replication through G-quadruplex motifs is promoted by the *Saccharomyces cerevisiae* Pif1 DNA helicase. *Cell* 145, 678-91.
- Paeschke K., McDonald K.R., Zakian V.A. (2010). Telomeres: structures in need of unwinding. *FEBS Lett.* 584, 3760-72.
- Pâques F., Haber J.E. (1999). Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 349-404.
- Pardo B., Marcand S. (2005). Rap1 prevents telomere fusions by nonhomologous end joining. *EMBO J.* 24, 3117-27.
- Parenteau J., Wellinger R.J. (1999). Accumulation of single-stranded DNA and destabilization of telomeric repeats in yeast mutant strains carrying a deletion of RAD27. *Mol. Cell Biol.* 19, 4143-52.
- Paschini M., Mandell E.K., Lundblad V. (2010). Structure prediction-driven in *Saccharomyces cerevisiae* identifies an interface between the t-RPA proteins Stn1 and Ten1. *Genetics* 185, 11-21.
- Paull T.T., Gellert M. (1998). The 3' to 5' exonuclease activity of Mre 11 facilitates repair of DNA double-strand breaks. *Mol. Cell* 1, 969-79.
- Pennock E., Buckley K., Lundblad V. (2001). Cdc13 delivers separate complexes to the telomere for end protection and replication. *Cell* 104, 387-96.
- Peterson S.E., Stellwagen A.E., Diede S.J., Singer M.S., Haimberger Z.W., Johnson C.O., Tzoneva M., Gottschling D.E. (2001). The function of a stem-loop in telomerase RNA is linked to the DNA repair protein Ku. *Nature Genet.* 27, 64-7.
- Petreaca R.C., Chiu H.C., Eckelhoefer H.A., Chuang C., Xu L., Nugent C.I. (2006). Chromosome end protection plasticity revealed by Stn1p and Ten1p bypass of Cdc13p. *Nat. Cell Biol.* 8, 748-55.
- Petreaca R.C., Chiu H.C., Nugent C.I. (2007). The role of Stn1p in *Saccharomyces cerevisiae* telomere capping can be separated from its interaction with Cdc13p. *Genetics* 177, 1459-74.

- Pike J.E., Burgers P.M., Campbell J.L., Bambara R.A. (2009). Pif1 helicase lengthens some Okazaki fragment flaps necessitating Dna2 nuclease/helicase action in the two-nuclease processing pathway. *J. Biol. Chem.* 284, 25170-80.
- Polotnianka R.M., Li J., Lustig A.J. (1998). The yeast Ku heterodimer is essential for protection of the telomere against nucleolytic and recombinational activities. *Curr. Biol.* 8, 831-4.
- Poloumienko A., Dershowitz A., De J., Newlon C.S. (2001). Completion of replication map of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome III. *Mol. Biol. Cell.* 12, 3317-27.
- Pope P.A., Bhaduri S., Pryciak P.M. (2014). Regulation of cyclin-substrate docking by a G1 arrest signaling pathway and the Cdk inhibitor Far1. *Curr. Biol.* 24, 1390-6.
- Porter S.E., Greenwell P.W., Ritchie K.B., Petes T.D. (1996). The DNA-binding protein Hdf1p (a putative Ku homologue) is required for maintaining normal telomere length in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 24, 582-5.
- Puglisi A., Bianchi A., Lemmens L., Damay P., Shore D. (2008). Distinct roles for yeast Stn1 in telomere capping and telomerase inhibition. *EMBO J.* 27, 2328-39.
- Qi H., Zakian V.A. (2000). The *Saccharomyces* telomere-binding protein Cdc13p interacts with both the catalytic subunit of DNA polymerase alpha and the telomerase-associated est1 protein. *Genes Dev.* 14, 1777-88.
- Raghuraman M.K., Brewer B.J., Fangman W.L. (1997). Cell cycle-dependent establishment of a late replication program. *Science* 276, 806-9.
- Raghuraman M.K., Winzeler E.A., Collingwood D., Hunt S., Wodicka L., Conway A., Lockhart D.J., Davis R.W., Brewer B.J., Fangman W.L. (2001). Replication dynamics of the yeast genome. *Science* 294, 115-21.
- Ray A., Runge K.W. (1999). The yeast telomere length counting machinery is sensitive to sequences at the telomere-nontelomere junction. *Mol. Cell. Biol.* 19, 31-45.
- Reed S.I., Hadwiger J.A., Lorincz A. (1985). Protein kinase activity associated with the product of the yeast cell division cycle gene CDC28. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 4055-4059.
- Ribaud V., Ribeyre C., Damay P., Shore D. (2012). DNA-end capping by the budding yeast transcription factor and subtelomeric binding protein Tbf1. *EMBO J.* 31, 138-49.
- Ribeyre C., Lopes J., Boulé J.B., Piazza A., Guédin A., Zakian V.A., Mergny J.L., Nicolas A. (2009). The yeast Pif1 helicase prevents genomic instability caused by G-quadruplex-forming CEB1 sequences in vivo. *PLoS Genet.* 5, e1000475.

- Ribeyre C., Shore D. (2012). Anticheckpoint pathways at telomeres in yeast. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *19*, 307-13.
- Richardson H.E., Lew D.J., Henze M., Sugimoto K., Reed S.I. (1992). Cyclin-B homologs in *Saccharomyces cerevisiae* function in S phase and in G2. *Genes Dev.* *6*, 2021-2034.
- Richardson H.E., Wittenberg C., Cross F., Reed S.I. (1989). An essential G1 function for cyclin-like proteins in yeast. *Cell* *59*, 1127-1133.
- Ritchie K.B., Mallory J.C., Petes T.D. (1999). Interactions of TLC1 (which encodes the RNA subunit of telomerase), TEL1, and MEC1 in regulating telomere length in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 6065-75.
- Ritchie K.B., Petes T.D. (2000). The Mre11p/Rad50p/Xrs2p complex and the Tel1p function in a single pathway for telomere maintenance in yeast. *Genetics* *155*, 475-9.
- Rouse J., Jackson S.P. (2002). Lcd1p recruits Mec1p to DNA lesions in vitro and in vivo. *Mol. Cell* *9*, 857-69.
- Rose M.D., Winston F., Hieter P. (1990). *Methods in yeast genetics: a laboratory course manual*. Cold Spring Harbor, New York.
- Ross K.E., Kaldis P., Solomon M.J. (2000). Activating phosphorylation of the *Saccharomyces cerevisiae* cyclin-dependent kinase, cdc28p, precedes cyclin binding. *Mol. Biol. Cell* *11*, 1597-609.
- Roy R., Meier B., McAinsh A D., Feldmann H.M., Jackson S.P., (2004). Separation-of-function mutants of yeast Ku80 reveal a Yku80p-Sir4p interaction involved in telomeric silencing. *J. Biol. Chem.* *279*, 86-94.
- Russo A.A., Jeffrey P.D., Pavletich N.P. (1996). Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation. *Nat. Struct. Biol.* *3*, 696-700.
- Sabourin M., Tuzon C.T., Zakian V.A. (2007). Telomerase and Tel1p preferentially associate with short telomeres in *S. cerevisiae*. *Mol. Cell* *27*, 550-61.
- Sanchez Y., Bachant J., Wang H., Hu F., Liu D., Tetzlaff M., Elledge S.J. (1999). Control of the DNA damage checkpoint by chk1 and rad53 protein kinases through distinct mechanisms. *Science* *286*, 1166-71.
- Sanchez Y., Desany B.A., Jones W.J., Liu Q., Wang B., Elledge S.J. (1996). Regulation of RAD53 by the ATM-Like Kinases MEC1 and TEL1 in Yeast Cell Cycle Checkpoint Pathways. *Science* *271*, 357-360.

- Sandell L.L., Zakian V.A. (1993). Loss of a yeast telomere: arrest, recovery, and chromosome loss. *Cell* 75, 729-39.
- Schleker T., Shimada K., Sack R., Pike B.L., Gasser S.M. (2010). Cell cycle-dependent phosphorylation of Rad53 kinase by Cdc5 and Cdc28 modulates checkpoint adaptation. *Cell Cycle* 9, 350-363.
- Schwob E., Bohm T., Mendenhall M.D., Nasmyth K. (1994). The B-type cyclin kinase inhibitor p40SIC1 controls the G1 to S transition in *S. cerevisiae*. *Cell* 79, 233-244.
- Schwob E., Nasmyth K. (1993). *CLB5* and *CLB6*, a new pair of B cyclins involved in DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 7, 1160–1175.
- Seufert W., Futcher B., Jentsch S. (1995). Role of a ubiquitin-conjugating enzyme in degradation of S- and M-phase cyclins. *Nature* 373, 78-81.
- Sfeir A., Kosiyatrakul S.T., Hockemeyer D., MacRae S.L., Karlseder J., Schildkraut C.L., de Lange T. (2009). Mammalian telomeres resemble fragile sites and require TRF1 for efficient replication. *Cell* 138, 90-103.
- Shampay J., Szostak J.W., Blackburn E.H. (1984). DNA sequences of telomeres maintained in yeast. *Nature* 310, 154-7.
- Shen Z.J., Hsu P.H., Su Y.T., Yang C.W., Kao L., Tseng S.F., Tsai M.D., Teng S.C. (2014). PP2A and Aurora differentially modify Cdc13 to promote telomerase release from telomeres at G2/M phase. *Nat. Commun.* 5, 5312.
- Shi T., Bunker R.D., Mattarocci S., Ribeyre C., Faty M., Gut H., Scrima A. Rass U., Rubin S.M., Shore D., Thomä N.H. (2013). Rif1 and Rif2 shape telomere function and architecture through multivalent Rap1 interactions. *Cell* 153, 1340-53.
- Shim E.Y., Chung W.H., Nicolette M.L., Zhand Y., Davis M., Zhu Z., Paull T.T., Ira G., Lee S.E. (2010). *Saccharomyces cerevisiae* Mre11-Rad50-Xrs2 and Ku proteins regulate association of Exo1 and Dna2 with DNA breaks. *EMBO J.* 29, 3370-80.
- Shinohara A., Ogawa H., Ogawa T. (1992). Rad51 protein involved in repair and recombination in *S. cerevisiae* is a RecA-like protein. *Cell* 69, 457–70.
- Shore D., Nasmyth K. (1987). Purification and Cloning of a DNA Binding Protein from Yeast That Binds to Both Silencer and Activator Elements. *Cell* 51, 721–732.
- Sidorova J.M., Mikesell G.E., Breeden L.L. (1995). Cell cycle-regulated phosphorylation of Swi6 controls its nuclear localization. *Mol. Biol. Cell.* 6, 1641-58.

- Siegmund R.F., Nasmyth K.A. (1996). The *Saccharomyces cerevisiae* Start-specific transcription factor Swi4 interacts through the ankyrin repeats with the mitotic Clb2/Cdc28 kinase and through its conserved carboxy terminus with Swi6. *Mol. Cell Biol.* 16, 2647-55.
- Simoneau A., Robellet X., Ladouceur A.M., D'Amours D. (2014). Cdk1-dependent regulation of the Mre11 complex couples DNA repair pathways to cell cycle progression. *Cell Cycle* 13, 1078-90.
- Skotheim J.M., Di Talia S., Siggia E.D., Cross F.R. (2008). Positive feedback of G1 cyclins ensures coherent cell cycle entry. *Nature* 454, 291-6.
- Skowyra D., Koepp D.M., Kamura T., Conrad M.N., Conaway R.C., Conaway J.W., Elledge S.J., Harper J.W. (1999). Reconstitution of G1 cyclin ubiquitination with complexes containing SCFGrr1 and Rbx1. *Science* 284, 662-665.
- Soudet J., Jolivet P., Teixeira M.T. (2014). Elucidation of the DNA end-replication problem in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell.* 53, 954-64.
- Soulas-Sprauel P., Rivera-Munoz P., Malivert L., Guyader G., Abramowski V., Revy P., Villartay J.P. (2007). V(D)J and immunoglobulin class switch recombinations: a paradigm to study the regulation of DNA end-joining. *Oncogene* 26, 7780-91.
- Steinberg-Neifach O., Lue N.F. (2015). Telomere DNA recognition in Saccharomycotina yeast: potential lessons for the co-evolution of ssDNA and dsDNA-binding proteins and their target sites. *Front. Genet.* 6, 162
- Stellwagen A.E., Haimberger Z.W., Veatch J.R., Gottschling D.E. (2003). Ku interacts with telomerase RNA to promote telomere addition at native and broken chromosome ends. *Genes Dev.* 17, 2384-2395.
- Stern B., Nurse P. (1996). A quantitative model for the cdc2 control of S phase and mitosis in fission yeast. *Trends Genet.* 12, 345-50.
- Stevenson J.B., Gottschling D.E. (1999). Telomeric chromatin modulates replication timing near chromosome ends. *Genes Dev.* 13, 146-51.
- Stracker T.H., Petrini J.H.J. (2011). The MRE11 complex: starting from the ends. *Nature reviews. Mol. Cell Biol.* 12, 90-103.
- Stuart D., Wittenberg C. (1995). CLN3, not positive feedback, determines the timing of CLN2 transcription in cycling cells. *Genes Dev.* 9, 2780-94.

- Sun J., Yang Y., Wan K., Mao N., Yu T.Y., Lin Y.C., DeZwaan D.C., Freeman B.C., Lin J.J., Lue N.F., Lei M. (2011). Structural bases of dimerization of yeast telomere protein Cdc13 and its interaction with the catalytic subunit of DNA polymerase  $\alpha$ . *Cell Res.* *21*, 258-74.
- Sun J., Yu E.Y., Yang Y., Confer L.A., Sun S.H., Wan K., Lue N.F., Lei M. (2009). Stn1-Ten1 is an Rpa2-Rpa3-like complex at telomeres. *Genes Dev.* *23*, 2900-14.
- Surana U., Amon A., Dowzer C., McGrew J., Byers B., Nasmyth K. (1993). Destruction of the CDC28/CLB mitotic kinase is not required for the metaphase to anaphase transition in budding yeast. *EMBO J.* *12*, 1969-1978.
- Surana U., Robitsch H., Schuster T., Fitch I., Futcher A.B., Nasmyth K. (1991). The role of CDC28 and cyclins during mitosis in the budding yeast *S. cerevisiae*. *Cell* *65*, 145-161.
- Sussel L., Shore D. (1991). Separation of transcriptional activation and silencing functions of the RAP1-encoded repressor/activator protein 1: isolation of viable mutants affecting both silencing and telomere length. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *88*, 7749-53.
- Sweeney F.D., Yang F., Chi A., Shabanowitz J., Hunt D.F., Durocher D. (2005). *Saccharomyces cerevisiae* Rad9 acts as a Mec1 adaptor to allow Rad53 activation. *Curr. Biol.* *15*, 1364-75.
- Symington L.S., Gautier J. (2011). Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annu. Rev. Genet.* *45*, 247-71.
- Szilard R.K., Jacques P.E., Laramée L., Cheng B., Galicia S., Bataille A.R., Yeung M., Mendez M., Bergeron M., Robert F., Durocher D. (2010). Systematic identification of fragile sites via genome-wide location analysis of gamma-H2AX. *Nature Struct. Mol. Biol.* *17*, 299-305.
- Takahashi Y.H., Schulze J.M., Jackson J., Hentrich T., Seidel C., Jaspersen S.L., Kobor M.S., Shilatifard A. (2011). Dot1 and histone H3K79 methylation in natural telomeric and HM silencing. *Mol. Cell* *42*, 118-26.
- Teixeira M.T., Arneric M., Sperisen P., Lingner J. (2004). Telomere length homeostasis is achieved via a switch between telomerase-extendible and -nonextendible states. *Cell* *117*, 323-35.
- Thuret J.Y., Valay J.G., Faye G., Mann C. (1996). Cdc15 (CAK in vivo), a novel Cdk-activating kinase. *Cell* *86*, 565-76.
- Tokiwa G., Tyers M., Volpe T., Futcher B. (1994). Inhibition of G1 cyclin activity by the Ras/cAMP pathway in yeast. *Nature* *371*, 342-345.



- Tseng S.F., Lin J.J., Teng S.C. (2006). The telomerase-recruitment domain of the telomere binding protein Cdc13 is regulated by Mec1p/Tel1p-dependent phosphorylation. *Nucleic Acids Res.* 34, 6327–36.
- Tseng S.F., Shen Z.J., Tsai H.J., Lin Y.H., Teng S.C. (2009). Rapid Cdc13 turnover and telomere length homeostasis are controlled by Cdk1-mediated phosphorylation of Cdc13. *Nucleic Acids Res.* 37, 3602–11.
- Tsolou A., Lydall D. (2007). Mrc1 protects uncapped budding yeast telomeres from exonuclease EXO1. *DNA Repair* 6, 1607-17.
- Tsukamoto Y., Taggart A.K., Zakian V.A. (2001). The role of the Mre11-Rad50-Xrs2 complex in telomerase-mediated lengthening of *Saccharomyces cerevisiae* telomeres. *Curr. Biol.* 11, 1328-35.
- Tyers M. (1996). The cyclin-dependent kinase inhibitor p40SIC1 imposes the requirement for Cln g1 cyclin function at Start. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 7772-6.
- Tyers M., Tokiwa G., Futcher B. (1993). Comparison of the *Saccharomyces cerevisiae* G1 cyclins: Cln3 may be an upstream activator of Cln1, Cln2 and other cyclins. *EMBO J.* 12, 1955-1968.
- Tyers M., Tokiwa G., Nash R., Futcher B. (1992). The Cln3-Cdc28 kinase complex of *S. cerevisiae* is regulated by proteolysis and phosphorylation. *EMBO J.* 11, 1773-1784.
- Usui T., Foster S.S., Petrini J.H. (2009). Maintenance of the DNA-damage checkpoint requires DNA-damage-induced mediator protein oligomerization. *Mol. Cell* 33, 147-59.
- Usui T., Ogawa H., Petrini J.H. (2001). A DNA damage response pathway controlled by Tel1 and the Mre11 complex, *Mol. Cell* 7, 1255-1266
- Vega L.R., Phillips J.A., Thornton B.R., Benanti J.A., Onigbanjo M.T., Toczyski D.P., Zakian V.A. (2007). Sensitivity of yeast strains with long G-tails to levels of telomere-bound telomerase. *PLoS Genet.* 3, e105.
- Veis J., Klug H., Koranda M., Ammerer G. (2007). Activation of the G2/M-specific CLB2 requires multiple cell cycle signals. *Mol. Cell Biol.* 27, 8364-73.
- Vodenicharov M.D., Laterreur N., Wellinger R.J. (2010). Telomere capping in non-dividing yeast cells requires Yku and Rap1. *EMBO J.* 29, 3007–19.
- Vodenicharov M.D., Wellinger R.J. (2006). DNA degradation at unprotected telomeres in yeast is regulated by the CDK1 (Cdc28/Clb) cell-cycle kinase. *Mol. Cell* 24, 127–37.

- Vodenicharov M.D., Wellinger R.J. (2007). The cell division cycle puts up with unprotected telomeres: cell cycle regulated telomere uncapping as a means to achieve telomere homeostasis. *Cell Cycle* 6, 1161-7.
- Vulliamy T., Marrone A., Goldman F., Dearlove A., Bessler M., Mason P.J., Dokal I. (2001). The RNA component of telomerase is mutated in autosomal dominant dyskeratosis congenital. *Nature* 413, 432-5.
- Wach A., Brachet A., Pöhlmann R., Philippsen P. (1994). New heterologous modules for classical or PCR-based disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 10, 1793-1808.
- Waga S., Stillman B. (1994). Anatomy of a DNA replication fork revealed by reconstitution of SV40 DNA replication in vitro. *Nature* 369, 207-12.
- Walker J.R., Corpina R.A., Goldberg J. (2001). Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature* 412, 607-14.
- Walmsley R., Chan C., Tye B., Petes T. (1984). Unusual DNA sequences associated with the ends of yeast chromosomes. *Nature* 310, 157-160.
- Wang S.S., Zakian V.A. (1990). Sequencing of *Saccharomyces* telomeres cloned using T4 DNA polymerase reveals two domains. *Mol. Cell Biol.* 10, 4415-9.
- Watson J. (1972). Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat. New Biol.* 139, 197-201.
- Weinert T.A., Hartwell L.H. (1993). Cell cycle arrest of cdc mutants and specificity of the RAD9 checkpoint. *Genetics* 134, 63-80.
- Wellinger R.J. (2010). When the caps fall off: responses to telomere uncapping in yeast. *FEBS letters* 584, 3734-40.
- Wellinger R.J., Ethier K., Labrecque P., Zakian V.A. (1996). Evidence for a new step in telomere maintenance. *Cell* 85, 423-33.
- Wellinger R.J., Wolf A.J., Zakian V.A. (1993a). *Saccharomyces* telomeres acquire single-strand TG1-3 tails late in S phase. *Cell* 72, 51-60.
- Wellinger R.J., Wolf A.J., Zakian V.A. (1993b). Origin activation and formation of single-strand TG1-3 tails occur sequentially in late S phase on a yeast linear plasmid. *Mol. Cell Biol.* 13, 4057-65.
- Wellinger R.J., Zakian V.A. (2012). Everything you ever wanted to know about *Saccharomyces cerevisiae* telomeres: beginning to end. *Genetics* 191, 1073-105.

- Wijnen H., Landman A., Futcher B. (2002). The G(1) cyclin Cln3 promotes cell cycle entry via the transcription factor Swi6. *Mol. Cell Biol.* 22, 4402-4418.
- Wiltzius J.J.W., Hohl M., Fleming J.C., Petrini J.H.J. (2005). The Rad50 hook domain is a critical determinant of Mre11 complex functions. *Nature Struct. Mol. Biol.* 12, 403–7.
- Wittenberg C., Reed S.I. (2005). Cell cycle-dependent transcription in yeast: promoters, transcription factors, and transcriptomes. *Oncogene* 24, 2746-2755.
- Wittenberg C., Sugimoto K., Reed S.I. (1990). G1-specific cyclins of *S. cerevisiae*. Cell cycle, periodicity, regulation by mating pheromone, and association with the p34cdc28 protein kinase. *Cell* 62, 225–237.
- Wotton D., Shore D. (1997). A novel Rap1p-interacting factor, Rif2p, cooperates with Rif1p to regulate telomere length in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 11, 748–760.
- Wright J.H., Gottschling D.E., Zakian V.A. (1992). *Saccharomyces* telomeres assume a non-nucleosomal chromatin structure. *Genes Dev.* 6, 197–210.
- Wright J.H., Zakian V.A. (1995). Protein-DNA interactions in soluble telosomes from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 23, 18–20.
- Wu D., Topper L.M., Wilson T.E. (2008). Recruitment and dissociation of nonhomologous end joining proteins at a DNA double-strand break in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 178, 1237-49.
- Wu Y., Dimaggio P.A., Perlman D.H., Zakian V.A., Garcia B.A. (2013). Novel phosphorylation sites in the *S. cerevisiae* Cdc13 protein reveal new targets for telomere length regulation. *J. Proteome Res.* 12, 316–27.
- Wu Y., Zakian V.A. (2011). The telomeric Cdc13 protein interacts directly with the telomerase subunit Est1 to bring it to telomeric DNA ends in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 20362-9.
- Xu L., Petreaca R.C., Gasparyan H.J., Vu S., Nugent C.I. (2009) TEN1 is essential for CDC13-mediated telomere capping. *Genetics* 183, 793-810.
- Xu Y., Rudshon M.D., Maringele L. (2011). A novel checkpoint and RPA inhibitory pathway regulated by Rif1. *PLoS Genet.* 7, e1002417.
- Zhang Y., Hefferin M.L., Chen L., Shim E.Y., Tseng H., Kwon Y., Sung P., Lee S.E., Tomkinson A.E. (2007). Role of Dnl4 – Lif1 in nonhomologous end-joining repair complex assembly and suppression of homologous recombination. *Nature Struct. Mol. Biol.* 14, 639–646.

- Zhang Y., Shim E.Y., Davis M., Lee S.E. (2009). Regulation of repair choice: Cdk1 suppresses recruitment of end joining factors at DNA breaks. *DNA Repair* 8, 1235-41.
- Zhu Z., Chung W.H., Shim E.Y., Lee S.E., Ira G. (2008). Sgs1 helicase and two nucleases Dna2 and Exo1 resect DNA double-strand break ends. *Cell* 134, 981-994.
- Zhu X., Gustafsson C.M. (2009). Distinct differences in chromatin structure at subtelomeric X and Y' elements in budding yeast. *PLoS One* 4, e6363
- Zierhut C., Diffley J.F. (2008). Break dosage, cell cycle stage and DNA replication influence DNA double strand break response. *EMBO J.* 27, 1875-1885.
- Zijlmans J.M., Martens U.M., Poon S.S., Raap A.K., Tanke H.J., Ward R.K., Lansdorp P.M. (1997). Telomeres in the mouse have large inter-chromosomal variations in the number of T2AG3 repeats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 7423-8.
- Zou L., Elledge S. J. (2003). Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science* 300, 1542–8.
- Zubko M.K., Guillard S., Lydall D. (2004). Exo1 and Rad24 differentially regulate generation of ssDNA at telomeres of *Saccharomyces cerevisiae* cdc13-1 mutants. *Genetics* 168, 103–15.

